



Joana Paixão Almeida

Licenciada em Biologia

**Caracterização do potencial
antiproliferativo de novo composto de prata
(Ag₂tmps₂)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Professora Doutora Maria Alexandra Núncio de
Carvalho Ramos Fernandes, Universidade Nova de Lisboa
Co-orientador: Professor Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana
Baptista, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutora Ana Isabel Antunes Tomaz Diniz

Vogal: Professora Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

Joana Paixão Almeida

**Caracterização do potencial antiproliferativo de
novo composto de prata (Ag_2tmps_2)**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade Nova de
Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia

Orientador:

Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Auxiliar, (FCT/UNL)

Co-orientador:

Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista, Professor Catedrático,
(FCT/UNL)

**Lisboa
2018**

Caracterização do potencial antiproliferativo de novo composto de prata (Ag₂tmps₂)

Copyright Joana Almeida, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Tenho, obrigatoriamente de começar, agradecendo à Professora Alexandra Fernandes por ter confiado em mim para o desenvolvimento deste projeto, assim como por toda a disponibilidade e ajuda prestada neste ano.

Agradeço igualmente ao Professor Pedro Baptista por toda a ajuda e paciência que teve para comigo durante este ano.

À Professora Fátima Guedes da Silva por se mostrar sempre disponível para tirar dúvidas sobre o composto. Foi uma grande ajuda para a minha compreensão do composto.

O meu obrigado a todos os membros dos laboratórios *Human Genetics and Cancer Therapeutics* e *Nanomedicine*, sendo que não posso deixar de agradecer à Doutora Catarina Roma-Rodrigues por toda a disponibilidade e ajuda no trabalho prático, assim como ao Doutor Luís Raposo e à Andreia Carvalho.

Liliane Raposo, foste uma amizade inesperada assim como o meu rochedo este ano, agradeço por todo o apoio e por estares sempre presente para me ouvires.

Aos alunos da UC de Projeto da Licenciatura em Bioquímica da FCT/UNL Paulo Faria e Sara Murilhas que caíram de “para-quedas” no laboratório mas que foram de uma grande ajuda. Sara um obrigada especial para ti pois tornaste-te uma grande amiga que me tem ajudado imenso nesta tese mas não só. Aproveito para agradecer a ajuda do Professor Aires de Sousa, pelo auxílio no docking molecular.

Ao Miguel, por teres sido uma surpresa inesperada.

E por fim à minha família e aos meus amigos que apesar de nem sempre ser fácil estiveram presentes quando precisei.

Resumo

O cancro continua a ser uma das doenças mais letais do mundo, apesar da profunda compreensão da doença e do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Assim, o desenvolvimento de novas moléculas que inibam seletivamente o crescimento de células tumorais, com menos efeitos secundários e/ou resistência, é há vários anos o foco na quimioterapia. Neste trabalho, é relatada a atividade antiproliferativa de um novo composto, tris(pirazolil)metanosulfonato de prata (Ps35), bem como o seu mecanismo de ação em células tumorais.

Os ensaios de viabilidade foram realizados em duas linhas tumorais humanas, nomeadamente numa linha derivada de um carcinoma do ovário e noutra derivada de um carcinoma colorretal e numa linha normal de fibroblastos, permitindo a caracterização do potencial antiproliferativo do Ps35. Os resultados mostraram que o composto tem um efeito citotóxico superior e com maior seletividade para a linha do carcinoma de ovário.

A atividade antiproliferativa observada foi devida à indução de morte celular por apoptose, provavelmente pela via extrínseca, e autofagia. Estudos de interação de DNA demonstraram que o Ps35 interage com o DNA, sem induzir genotoxicidade ou bloquear a progressão do ciclo celular. A análise de proteómica revelou que a maioria das proteínas identificadas está envolvida na apoptose e regulação da resposta ao *stress*, corroborando os resultados anteriores sobre a morte das células do carcinoma de ovário.

Palavras-chave: Cancro, Quimioterapia, Metalofármacos, Prata, Citotoxicidade

Abstract

Cancer is still one of the deadliest diseases worldwide despite the deep understanding of the disease and the development of new therapeutic approaches. Thus, the development of novel molecules that maybe selectively inhibit the growth of cancer cells, avoid side effects and/or acquired resistance has long been the focus in chemotherapy. Here, we report the antiproliferative activity of a new compound, silver(I) tris(pyrazolyl)methanesulfonate (Ps35), as well as its mechanism of action in cancer cells.

Viability assays were performed in ovarian, colorectal cancer cell lines and normal human fibroblasts, allowing the characterization of the antiproliferative potential of Ps35. Results showed that Ps35 has a higher cytotoxic effect as well as higher selectivity for the ovarian carcinoma cell line.

The observed antiproliferative activity was due to the induction of cell death by apoptosis, probably via the extrinsic pathway and autophagy. DNA interaction studies demonstrated that Ps35 interacts with DNA, however without causing genotoxicity or cell cycle arrest. Proteomics analysis revealed that the majority of the identified proteins are involved in apoptosis and stress response regulation, corroborating the previous results about ovarian carcinoma cells death.

Keywords: Cancer, Chemotherapy, Metallodrugs, Silver, cytotoxicity

Índice Geral

Resumo	ix
Abstract.....	xi
Índice de figuras	xvii
Índice de tabelas	xix
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xx
1. Introdução	1
1.1. Cancro.....	1
1.2. Distribuição, Incidência e Mortalidade	1
1.2.1. Carcinoma do Ovário.....	2
1.3. Causas	3
1.4. Biologia do Cancro	3
1.4.1. Carcinogénese.....	6
1.4.2. Regulação do ciclo celular.....	8
1.4.3. Mecanismos de Morte Celular.....	10
1.4.3.1. Apoptose.....	10
1.4.3.1.1. Apoptose Extrínseca	11
1.4.3.1.2. Apoptose Intrínseca.....	11
1.4.3.2. Autofagia.....	12
1.5. Terapêutica em Cancro	13
1.5.1. Quimioterapia	13
1.5.1.1. Compostos metálicos no tratamento do cancro	15
1.5.1.1.1. Potencial da Prata como centro metálico em compostos antitumorais	16
1.5.1.1.2. Ligando Tris(pirazolil)metanosulfonato em compostos antitumorais	17
1.6. Genética e Tratamento do Carcinoma do Ovário	19
1.7. Contexto e Motivação	19
2. Materiais e Métodos.....	21
2.1. Composto em Estudo.....	21
2.1.1. Solubilidade do composto	22
2.2. Linhas Celulares Humanas.....	22
2.2.1. Características.....	22
2.2.2. Manutenção de culturas celulares.....	23
2.3. Ensaio de citotoxicidade	24
2.4. Adesão Celular.....	25
2.5. Potencial Apoptótico	26
2.5.1. Marcação com Hoechst 33258 e Iodeto de Propídeo	26
2.5.2. Marcação com AnexinaV-FITC e IP.....	26
2.5.3. Alteração do potencial de membrana mitocondrial	27
2.5.4. Produção de Espécies Reativas de Oxigénio	28
2.5.5. Proteínas anti- e pro-apoptóticas por <i>Western blot</i>	28

2.5.5.1.	Preparação das amostras	28
2.5.5.2.	SDS-PAGE e transferência para membrana de nitrocelulose	29
2.5.5.3.	Incubação com anticorpo primário e secundário.....	29
2.5.5.4.	Exposição do filme.....	30
2.6.	Autofagia	30
2.7.	Progressão do Ciclo celular	30
2.8.	Localização	31
2.9.	Interação do composto com o DNA <i>in vitro</i>	32
2.9.1.	Clivagem de DNA plasmídico.....	32
2.9.2.	<i>Melting</i> de Alta Resolução (HRM)	32
2.9.3.	Espectroscopia UV-Visível	33
2.10.	Interação do composto com a albumina de soro bovino (BSA) e humana (HSA) <i>in vitro</i>	33
2.10.1.	Espectroscopia	33
2.10.1.1.	Absorção UV-Visível.....	33
2.10.1.2.	Fluorescência	33
2.10.2.	<i>Docking</i> molecular	34
2.11.	Proteómica.....	34
2.11.1.	Preparação da amostra, precipitação e purificação	34
2.11.2.	Eletroforese bidimensional (2-DE): Focagem isoeletrica e SDS-PAGE	35
2.11.3.	Revelação dos géis	36
2.12.	Estatística	36
3.	Resultados e Discussão.....	37
3.1.	Composto em Estudo.....	37
3.1.1.	Solubilidade do composto	37
3.2.	Ensaio de citotoxicidade	39
3.3.	Adesão Celular.....	42
3.4.	Potencial apoptótico.....	44
3.4.1.	Marcação com Hoechst e IP	44
3.4.2.	Marcação com AnexinaV-FITC e IP.....	46
3.4.3.	Alteração do potencial de membrana mitocondrial	47
3.4.4.	Produção de espécies reativas de oxigénio	49
3.4.5.	Proteínas anti- e pro-apoptóticas por <i>Western blot</i>	51
3.5.	Autofagia	52
3.6.	Progressão do Ciclo Celular	54
3.7.	Localização	56
3.8.	Interação do composto com o DNA <i>in vitro</i>	56
3.9.	Interação do composto com a albumina de soro bovino (BSA) e humana (HSA) <i>in vitro</i>	57
3.10.	Proteómica.....	58
4.	Conclusões e Perspetivas futuras.....	65
5.	Bibliografia.....	67
6.	Anexo	75
6.1.	Anexo A.....	75

6.2. Anexo B..... 75

6.3. Anexo C 77

6.4. Anexo D 79

Índice de figuras

Figura 1.1 – Incidência e mortalidade na Europa em 2012 para os mais comuns tipos de cancro.....	2
Figura 1.2 - Representação das características adquiridas pelas células cancerígenas propostas por Hanahan e Weinberg.....	6
Figura 1.3 - Representação dos principais passos no processo metastático.	8
Figura 1.4 - Representação das fases do ciclo celular e dos complexos CDK/ciclinas que são ativados nas respectivas fases, assim como os <i>checkpoints</i> envolvidos na regulação do ciclo celular.9	
Figura 1.5 – Representação do processo de morte celular por apoptose.	11
Figura 1.6 - Representação dos passos e moléculas envolvidos no processo de autofagia.	13
Figura 1.7 - Estrutura química da platina, carboplatina e oxaliplatina.	16
Figura 1.8 - Estrutura de um escorpionato.	18
Figura 2.1 - Estrutura do composto Ps35.....	21
Figura 3.1 - Espectros de absorção de soluções a fresco do composto Ps35 nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M.....	38
Figura 3.2 - Espectros de absorção de soluções a 50 μ M do composto Ps35 nas condições: a fresco, armazenada à Tamb por 24 horas e armazenada a 4 °C por 24 horas.....	38
Figura 3.3 - Viabilidade celular da linha tumoral A2780 e HCT116 após 48 horas de exposição ao composto Ps35.....	40
Figura 3.4 - Viabilidade celular na linha celular de fibroblastos após 48 horas de exposição ao composto Ps35.....	40
Figura 3.5 - Viabilidade celular na linha celular A2780 após 48 horas de exposição aos compostos: Ps35, Ag ₂ O, tpms e Ag ₂ O+tpms.....	42
Figura 3.6 - Células da linha tumoral A2780 marcadas com Hoechst 33258 e IP para a visualização de células apoptóticas/necróticas.	45
Figura 3.7 - Percentagem de células com alterações morfológicas típicas de células em apoptose na linhagem A2780 após exposição ao IC ₅₀ do composto Ps35 após 48 horas de exposição.....	45
Figura 3.8 - Quantificação das células HCT116 em apoptose por de citometria de fluxo com a marcação dupla com Anexina-FITC e IP. As células HCT116 foram expostas ao IC ₅₀ para esta linha celular (4,7 μ M), a 0,1 % de (v/v) DMSO (controlo) e a 0,4 μ M de DOX por 48 horas.....	47
Figura 3.9 - Células da linha tumoral A2780 marcadas com a sonda JC-1 para análise do efeito do composto no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ M).....	48
Figura 3.10 - Rácio da fluorescência verde/vermelha do potencial de membrana mitocondrial.	49
Figura 3.11 - Células da linha tumoral A2780 marcadas com o corante H ₂ DCF-DA para análise do aumento de produção de ROS.....	50
Figura 3.12 - Quantificação da intensidade de fluorescência do corante H ₂ DCF-DA na linha celular A2780.	51
Figura 3.13 – Expressão de BAX e BCL-2 em células A2780 após incubação por 48 horas com o IC ₅₀ do Ps35.....	52
Figura 3.14 - Células da linha tumoral A2780 marcadas com a sonda Cyto-ID para análise dos compartimentos autofágicos.	53

Figura 3.15 - Percentagem de células com compartimentos autofágicos na linha celular A2780.....	54
Figura 3.16 – Alteração na progressão do ciclo celular nas células A2780 após exposição ao IC50 do Ps35 e a 0,1 % (v/v) de DMSO, por 9 horas, 12 horas e 24 horas.....	55
Figura 3.17 - Variação no nível da expressão das proteínas na linha tumoral A2780 exposta ao Ps35.	59
Figura 3.18 - Géis resultantes de eletroforese bidimensional de extratos proteicos de células tumorais A2780.	61
Figura 6.1 - Viabilidade celular da linha tumoral A2780 e HCT116 após 48 horas de exposição ao composto Ps35.	75
Figura 6.2 - Avaliação da mobilidade eletroforética da interação entre pDNA (pUC18) e o composto Ps35.....	76
Figura 6.3 – Primeiras derivadas das curvas de <i>melting</i> , obtidas no ensaio de <i>HRM</i> com as amplicões <i>MYBPC3_ex7</i> após incubação com Ps35 (100 µM).	76
Figura 6.4 - Perfis de <i>melting</i> obtidas para amostras analisadas nos ensaios espectroscópicos de desnaturação térmica.	77
Figura 6.5 - Parâmetros utilizados no docking molecular.	77
Figura 6.6 - Espectros de absorção em UV-Visível de interação entre 15 µM de BSA e concentração variável de Ps35.	78
Figura 6.7 - Espectro de intensidade de fluorescência após excitação a 295nm para interações entre albumina e Ps35.	78
Figura 6.8 - Gel de referencia da linha celular HCT116.	79

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Propriedades do composto utilizado no presente estudo.	21
Tabela 2.2 - Linhas Celulares utilizadas neste trabalho prático e as suas características.	22
Tabela 2.3 - Programa utilizado na focagem isoeléctrica.	35
Tabela 3.1 - Citotoxicidade do composto Ps35.	41
Tabela 3.2 - Variação da adesão celular na linhagem A2780 após 3, 24 ou 48 horas de exposição ao IC_{50} do Ps35.	43
Tabela 3.3 - Percentagem de células A2780, na fase G0/G1, S e G2/M, quando exposta ao IC_{50} do Ps35 e a 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo) durante 9, 12 ou 24 horas.	55
Tabela 3.4 - Proteínas identificadas nos géis resultantes de eletroforese bidimensional.	60
Tabela 6.1 - Constituintes e respetivos volumes das soluções preparadas para o ensaio de HRM. ...	75
Tabela 6.2 - Resultados de energia de ligação do composto Ps35 aos <i>binding site</i> 1 e 2 da HSA obtidos através de múltiplas experiências de simulação de docking molecular.	79

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A2780	Linha proveniente de um carcinoma de ovário humano
APAF-1	Do inglês <i>Apoptosis protease activating factor-1</i>
APS	Persulfato de amônio, do inglês <i>Ammonium Persulfate</i>
ATCC	Do inglês American Type Culture Collection
ATGs	Proteínas centrais da autofagia
ATM	Do inglês <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	Do inglês <i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related</i>
BAK	Do inglês <i>Bcl-2 homologous antagonist</i>
BAX	Do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	Do inglês <i>B-cell lymphoma protein 2</i>
BCL-X	Do inglês <i>Bcl-2-like protein 1</i>
Bid	Do inglês <i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BRCA1	Do inglês <i>Breast cancer 1 susceptibility gene</i>
BRCA2	Do inglês <i>Breast cancer 2 susceptibility gene</i>
BSA	Albumina do soro bovino, do inglês <i>Bovine serum albumin</i>
Caspases	Protease de cisteína, do inglês <i>Cysteine-aspartic protease</i>
Cdc25c	Do inglês <i>M-phase inducer phosphatase 3</i>
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas, do inglês <i>Cyclin-dependent protein kinases</i>
CHAPS	3-[(3-cloramidopropil) dimetilamonio]-1 propanosulfonato
c-myc	Do inglês <i>Myc proto-oncogene protein</i>
DCF	2,7-diclorofluorescina
DMEM	Do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Sulfóxido de dimetilo, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DOX	Doxorrubicina
DTT	Ditiotreitol
E2F	Fator de transcrição E2, do inglês <i>E2 transcription factor</i>
FBS	Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
H2DCF-DA	diclorofluoresceína diacetato
HCT116	Linha proveniente de um carcinoma colorretal humano
Her2/neu	Do inglês <i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2</i>
Hoechst	Do inglês Phenol,4-[5-(4-methyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-trihydrochloride
HSA	Albumina do soro humano, do inglês <i>Human serum albumin</i>
HtrA2	Do inglês <i>High temperature requirement protein A2</i>
IC50	Concentração de composto para o qual existe redução da viabilidade celular para 50%
ICP-AES	Espetrometria de emissão atômica com plasma indutivo, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry</i>
IEF	Focagem Isoelétrica
IP	Iodeto de Propídio
IPG	Gradiente de pH imobilizado
JC-1	Do inglês 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3 tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
K-ras	GTPase KRas
LC3	Do inglês <i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A</i>

MEM	Aminoácidos não essenciais
mTOR	Do inglês <i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS	Do inglês [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxymetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]
Myt1	Do inglês <i>Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase</i>
p21	Do inglês <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
PBS	Tampão de Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDB	Do inglês <i>Protein data bank</i>
Pen/Strep	Penicilina/ Estreptomicina
PES	Etossulfato de fenazina
PMSF	Flureto de fenilmetilsulfonilo, do inglês phenylmethylsulfonyl fluoride
Ps35	tris(pirazolil)metanosulfonato de prata
Rb	Proteína do retinoblastoma, do inglês <i>Retinoblastoma protein</i>
RIP	Do inglês <i>Receptor-Interacting Protein</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	Do inglês Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
Smac	Do inglês <i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Tamb	Temperatura ambiente
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>
tp	hidrotris(pirazolil)borato
TP53	Gene que codifica para a proteína p53
tpms	tris(pirazolil)metanosulfonato
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth</i>
Vps34	Do inglês <i>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3</i>
WEE1	Do inglês <i>Wee1-like protein kinase</i>
WHO	Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
$\Delta\Psi$	Potencial da membrana mitocondrial

1. Introdução

1.1. Cancro

Em adulto, o corpo humano é composto por aproximadamente 10^{15} células, sendo a grande maioria destas sujeitas a processos de divisão e diferenciação. Para que estes processos ocorram eficazmente é necessário um controlo preciso na multiplicação celular. Este é conseguido através de uma rede de mecanismos complementares que governam a proliferação e a morte celular (Weinberg 2013; Bertram 2001). Assim qualquer fator que altere este balanço tem o potencial de variar o número de células num órgão ou tecido particular. Após várias gerações, a multiplicação descontrolada de um conjunto de células num determinado local será clinicamente detetada como uma neoplasia (Bertram 2001).

O cancro, que representa um grupo de doenças característico dos organismos multicelulares superiores, é definido como um crescimento anormal de células, num determinado tecido/órgão, originado por uma desregulação entre a proliferação e a morte celular que, com o passar do tempo, irá eventualmente evoluir numa população celular com capacidade de invadir tecidos circundantes e mais tarde metastizar (Pecorino 2012; Ruddon 2007). Causa uma morbilidade significativa e, não sendo tratado, acabará por levar à morte do indivíduo (Ruddon 2007).

1.2. Distribuição, Incidência e Mortalidade

A Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO) estima que em 2015 o cancro foi responsável pela morte de 8,8 milhões de pessoas globalmente. Isto significa que 1 em cada 6 pessoas morreram de cancro nesse ano (World Health Organization 2018).

O cancro é uma das principais causas de morte tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Todos os anos o número de casos aumenta, seja devido ao crescimento da população ou ao seu envelhecimento. Este aumento de incidência é particularmente notado nos países em desenvolvimento, onde reside 82% da população mundial (Torre et al. 2015). Em geral, as taxas de incidência para todos os tipos de cancro são duas vezes superiores nos países desenvolvidos, quando comparadas com as taxas nos países em desenvolvimento. No entanto, a taxa de mortalidade nos países desenvolvidos é apenas 8 a 15% superior à dos países em desenvolvimento. Esta disparidade reflete principalmente as diferenças nos perfis do cancro e o acesso a tratamento. Por outro lado, outra causa para esta disparidade é o fato de nos países em desenvolvimento o cancro ser muitas vezes detetado em fases tardias do desenvolvimento (Torre et al. 2015).

Quanto à incidência, certos tipos de cancro são mais predominantes de países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Exemplos disto são o cancro da próstata, da mama, colorretal e dos pulmões, cujas taxas são várias vezes superiores nos países desenvolvidos comparativamente a estas nos países em desenvolvimento. Por outro lado, o cancro do fígado, do estômago e cervical é mais comum em

países menos desenvolvidos, sendo estes casos atribuídos predominantemente a infeções (Torre et al. 2015).

Na Europa, estima-se que em 2012 existiram mais de 3,4 milhões de novos casos de cancro, onde 1,8 milhões ocorreram em homens e 1,6 milhões em mulheres (Ferlay et al. 2013). O cancro com maior incidência foi o cancro da mama, seguido pelo cancro colorretal, dos pulmões e da próstata, sendo que estes quatro tipos de cancro em conjunto representam metade das estimativas do cancro na Europa (figura 1.1) (GLOBOCAN 2012). Por outro lado, nos homens os mais comuns sítios primários foram a próstata seguido dos pulmões, colorretal e bexiga, enquanto que nas mulheres o cancro da mama foi de longe a neoplasia mais detetada, seguido do colorretal e do útero (GLOBOCAN 2012). Ainda em 2012, estima-se que morreram 1,75 milhões de pessoas devido ao cancro, tendo o cancro do pulmão representado a causa de morte mais frequente, seguido do cancro colorretal, da mama e do estômago (figura 1.1) (Ferlay et al. 2013). Os valores da taxa de mortalidade na Europa devido a cancro todos os anos se agravam sendo estimado que morram por cancro, em 2018, 765 mil homens e 617 mil mulheres (Malvezzi et al. 2018).

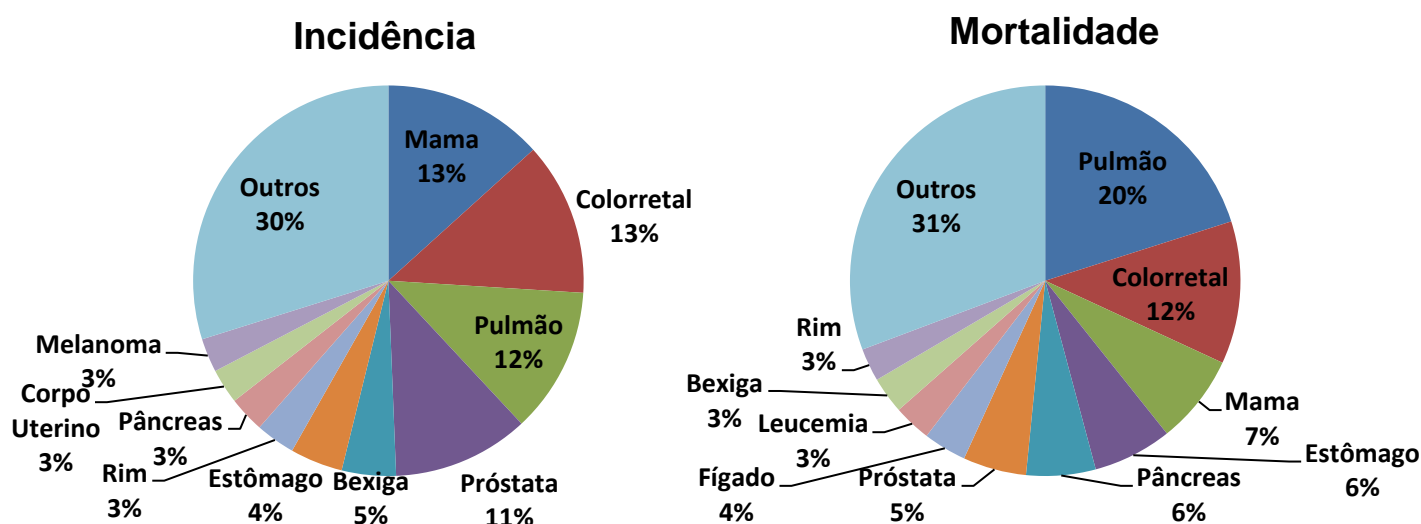


Figura 1.1 – Incidência e mortalidade na Europa em 2012 para os mais comuns tipos de cancro. (Adaptado de GLOBOCAN 2012).

Quanto a Portugal, este segue a tendência da Europa, existindo um aumento regular da incidência de cancro a uma taxa de aproximadamente 3% ao ano, sendo o cancro do pulmão a neoplasia com uma maior taxa de mortalidade (Direção-Geral da Saúde 2017).

1.2.1. Carcinoma do Ovário

O carcinoma do ovário é uma das neoplasias mais letais, com cerca de 239 mil casos novos e 152 mil mortes, por ano mundialmente. A maioria dos casos é na Europa do Leste e Central, Estados Unidos da América e Canadá. Devido ao facto de os sintomas serem vagos e de difícil perceção, um

diagnóstico em fase inicial é bastante difícil e só cerca de 25% dos cancros são detetados num estado localizado. Assim a doença tipicamente diagnosticada em estados tardios apresenta uma taxa de sobrevivência a 5 anos de, unicamente, 29% (Brett M. et al. 2017).

1.3. Causas

As células tumorais são caracterizadas por alterações na expressão de múltiplos genes, sendo que são estas alterações que causam a desregulação do programa normal de divisão e diferenciação (Ruddon 2007). Estas alterações podem ser hereditárias ou adquiridas durante a vida. Assim as causas do cancro são classificadas em dois grandes grupos: internas ou externas (referidas como causas ambientais) (American Cancer Society 2016; National Cancer Institute 2004).

A classificação como causa interna está relacionada com fatores genéticos ou seja a aquisição de mutações somáticas ou nalguns casos mutações na linha germinativa e portanto hereditárias e alterações nos níveis hormonais e imunitários (American Cancer Society 2016). No entanto, a grande maioria das mutações causadoras de cancro não são internas, ocorrendo devido à exposição a determinados fatores ambientais que induzem alterações genéticas, os chamados agentes carcinogéneos. Estes fatores ambientais potencialmente causadores de cancro são geralmente escolhas que se fazem no dia-a-dia como: fumar cigarros, o consumo sistemático de álcool, excessiva exposição a radiação ultravioleta, falta de exercício ou uma dieta pobre (Pecorino 2012; National Cancer Institute 2004). Outros fatores ambientais, difíceis de evitar, incluem a exposição a determinados fármacos, radiação, agentes infecciosos e químicos que podem estar presentes no ar, água ou comida. Por fim, estas duas causas (genética e ambiental) podem ainda interligar-se quando determinadas alterações genéticas contribuem para o aumento da suscetibilidade a carcinogéneos ambientais. Por exemplo, uma alteração genética pode diminuir a capacidade de determinado indivíduo eliminar um carcinogéneo do sangue (National Cancer Institute 2004).

1.4. Biologia do Cancro

De um ponto de vista clínico, o cancro representa um grande grupo de doenças que variam na idade de aparecimento, taxa de crescimento, estado de diferenciação celular, desenvolvimento aquando a deteção no diagnóstico, capacidade de invasão, potencial de metastização, resposta à terapia e prognóstico (Weinberg 2013). Mas, de um ponto de vista molecular e de biologia celular, o cancro representa um número relativamente pequeno de doenças, causadas por defeitos moleculares semelhantes no funcionamento celular e que resultam dos mesmos tipos de alterações aos genes de uma célula. Em última análise, o cancro é uma doença genética pois todos os cancros têm alguma alteração na expressão ou função de um gene (Ruddon 2007).

A organização celular dos tecidos dos eumetazoários tornou possível a evolução de uma imensa diversidade de formas anatómicas. Muita desta diversidade pode ser relacionada com o facto das células – unidades que estão na base da formação dos tecidos e órgãos – serem dotadas de uma grande autonomia e versatilidade. A grande maioria das células do organismo é portadora de um

genoma completo, possuindo muito mais informação do que uma célula precisará para cumprir as suas funções. Além disso, muitas retêm a capacidade de crescer e dividir mesmo após o desenvolvimento do organismo estar completo (Weinberg 2013). Assim, por um lado, esta manutenção da capacidade proliferativa e participação na morfogénese torna possível a manutenção dos tecidos num organismo adulto durante a sua vida toda. Por outro lado, esta versatilidade e autonomia de que as células são dotadas apresentam também um grave perigo, pois estas podem ganhar acesso a informação nos seus genomas que normalmente lhes seria negada, e assim assumir funções inapropriados para o normal funcionamento do tecido onde estão inseridas, como é o caso no cancro (Weinberg 2013).

Existem vários mecanismos pelos quais pode ocorrer alteração da expressão genética. Podem-se dar via uma alteração direta ao DNA (como mutações em genes, translocações cromossomais, amplificações, deleções, perda de heterozigotia, perda de *imprinting* genómico) ou via uma transcrição ou tradução anormal (Ruddon 2007). No entanto, o resultado final será sempre um desequilíbrio entre a proliferação e morte celular que levará a uma expansão do tecido tumoral (Pecorino 2012). Com isto em mente, o cancro é geralmente considerado uma doença do envelhecimento, uma vez que a taxa de incidência aumenta exponencialmente entre os 40 a 80 anos. Pensa-se que este facto está relacionado com o efeito combinado da acumulação de alterações genéticas, aumento do silenciamento epigenético de genes, disfunção dos telómeros e alteração do estroma dos tecidos (Ruddon 2007).

Existem três classes de genes que ao sofrerem alguma das alterações referidas anteriormente induzem o processo de carcinogénese, nomeadamente oncogenes, genes supressores de tumores e genes de estabilidade (Pecorino 2012; Vogelstein and Kinzler 2004). No entanto tem de se ter sempre presente que não é uma única mutação num gene de alguma destas classes que irá causar cancro, pois as células têm múltiplos mecanismos que as protegem contra os efeitos potencialmente letais de mutações genéticas. Assim, só quando existem vários genes afetados é que há o potencial de se desenvolver um cancro (Vogelstein and Kinzler 2004).

Mutações em proto-oncogenes tornam estes genes em oncogenes constitutivamente ativos ou passam a ativos em condições que o gene *wild-type* não ficaria. Geralmente uma mutação somática num dos alelos de um proto-oncogene é suficiente para conferir vantagem seletiva no crescimento da célula (Pecorino 2012). Os genes supressores de tumores são o contrário dos oncogenes em relação às alterações genéticas, no sentido em que uma mutação nesse tipo de genes reduz a atividade do produto do gene. Também contrariamente aos oncogenes, com os genes supressores de tumores é geralmente requerido que ocorram mutações nos dois alelos, materno e paterno, para a célula ganhar uma vantagem seletiva (Pecorino 2012). No entanto já existem casos descritos de haploinsuficiência, ou seja, só ocorreu mutação num dos alelos sendo que o outro se encontrava funcional, mas a célula conseguiu desenvolver algum nível de vantagem seletiva (Philipp-Staheli, Payne, and Kemp 2001; Konishi et al. 2011). A um nível fisiológico, mutações em oncogenes e genes supressores de tumores operam de forma similar: eles conduzem o processo neoplásico por aumento de células tumorais, através da estimulação de divisão celular ou por inibição de morte celular (Vogelstein and Kinzler

2004). Por fim, a terceira classe de genes consiste nos genes de estabilidade, os quais promovem o desenvolvimento de cancro de uma forma completamente diferente quando mutados. Esta classe inclui genes responsáveis por reparar erros ocasionais que se dão aquando a replicação do DNA ou erros induzidos por agentes mutagénicos. Inclui também genes que controlam largas porções dos cromossomas, como genes responsáveis pela recombinação meiótica ou segregação dos cromossomas (Vogelstein and Kinzler 2004). Estes genes de estabilidade mantêm as alterações genéticas num mínimo e assim, quando sofrem alterações que os inativa, as mutações noutros genes vão aumentar a taxas bastante elevadas. Quando isto ocorre, todos os genes têm o potencial de sofrer mutações, mas só mutações nos oncogenes e nos genes supressores de tumores, que afetam o crescimento celular, podem conferir vantagem seletiva à célula. Como com os genes supressores de tumores, também nos genes de estabilidade é necessário que os dois alelos sejam inativados por mutação (Vogelstein and Kinzler 2004).

Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram seis propriedades distintas e complementares relacionadas com o crescimento tumoral e a sua metastização, de forma a proporcionar uma fundação para a compreensão da biologia do cancro. As seis propriedades propostas foram: proliferação independente de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, evasão à morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, indução de angiogénese e, por fim, capacidade de invadir tecidos adjacentes e metastizar (Hanahan and Weinberg 2000).

Alguns anos mais tarde, os mesmos autores propuseram duas novas propriedades: reprogramação do metabolismo energético e capacidade de evasão ao sistema imunitário (Hanahan and Weinberg 2011). Assim, segundo estes autores, o cancro adquire estas oito propriedades funcionais que permitem às células tumorais sobreviver, proliferar e disseminar (figura 1.2). Estas propriedades são adquiridas em diferentes tumores por mecanismos distintos, e em diferentes períodos durante os vários passos da carcinogénese (Hanahan and Weinberg 2011). Estes autores referem ainda duas características que podem vir a auxiliar o cancro a adquirir as oito propriedades mencionadas (figura 1.2), sendo a característica, mais proeminente, o desenvolvimento da instabilidade genómica nas células tumorais. Esta gera mutações aleatórias, incluindo rearranjos cromossomais, e pensa-se que, além de ser central no desenvolvimento neoplásico, também está na base do desenvolvimento de resistência aos agentes quimioterapêuticos. A segunda característica refere-se à capacidade do tumor de promover inflamação (Hanahan and Weinberg 2011; Floor et al. 2012).

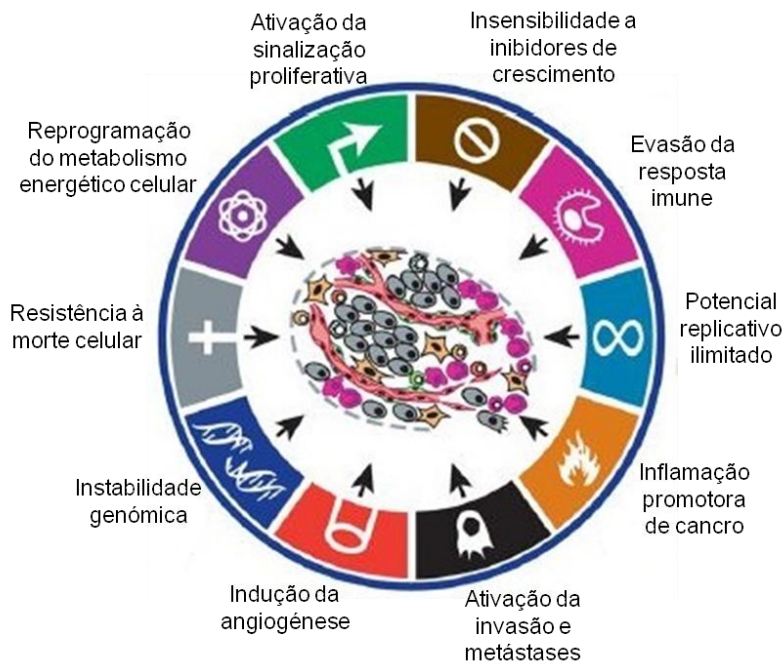


Figura 1.2 - Representação das características adquiridas pelas células cancerígenas propostas por Hanahan e Weinberg. (Adaptado de Hanahan and Weinberg 2011).

1.4.1. Carcinogénese

Independentemente do número de mutações envolvidas no processo de carcinogénese é útil pensar neste processo como ocorrendo em três fases bem definidas: iniciação, promoção e progressão (Pitot 1993; Moolgavkar and Luebeck 2003). Na primeira fase, iniciação, uma célula com capacidade de replicar (célula estaminal ou uma célula parcialmente diferenciada) adquire mutações, que lhe permite escapar da homeostasia que controla o crescimento celular e lhe conferem uma vantagem seletiva. Na segunda fase, fase de promoção, a célula que entrou em iniciação começa um processo de expansão clonal localizada, que irá desenvolver uma população de células que partilham as mesmas características. A partir desta fase, as células vão acumulando alterações genéticas. Com o tempo, uma destas alterações fará com que a célula passe a ter um fenótipo maligno, sendo que quando isto ocorre entramos na terceira fase, progressão. Nesta fase ocorre a expansão clonal do tumor para outros locais, ou seja, ocorre a metastização: distribuição e crescimento das células tumorais noutros órgãos (Moolgavkar and Luebeck 2003; Vogelstein and Kinzler 2004).

De acordo com a forma como se dá o desenvolvimento do tumor existe um critério que segrega os tumores em duas categorias gerais, dependendo do seu grau de agressividade no crescimento. Assim, os tumores que crescem localmente sem invadir tecido adjacente são classificados como benignos. Os que invadem os tecidos adjacentes e distribuem-se pelo organismo em metástases são classificados como malignos (Pecorino 2012). Normalmente, as células que formam o tumor maligno estão num estado menos diferenciado quando comparado com as células normais que formam o tecido de onde são originadas. Por outro lado, as células do tumor benigno têm tendência a manter um fenótipo mais próximo às células normais do tecido. Esta distinção entre tumor benigno e maligno é crucial para determinar o tratamento e prognóstico apropriado para o indivíduo que tem o tumor,

pois na grande maioria dos casos um tumor primário em crescimento é benigno e não irá causar dano no hospedeiro, sendo que mortes causadas por estes tipos de tumores são relativamente incomuns. A grande mortalidade relacionada com o cancro deriva dos tumores malignos devido à sua capacidade de desenvolver metástases (Weinberg 2013; Pecorino 2012).

O evento crítico que torna um tumor benigno, com um crescimento estável mas lento, num tumor mais agressivo e de rápido crescimento não está bem definido, mas esta conversão passa sem dúvida pela vascularização do tumor. Enquanto os tumores são pequenos estes conseguem obter os nutrientes e oxigénio necessário por difusão, mas à medida que se dá o crescimento e progressão do tumor, esta forma de obtenção de nutrientes torna-se limitativa. Neste ponto crítico, os tumores podem desenvolver a capacidade de induzir o crescimento de capilares a partir do tecido normal que os rodeia, processo ao qual se dá o nome de angiogénese (Bagherpoorfard and Soheili 2018; Jiang and Liu 2010). Este é um processo normal no desenvolvimento do organismo, sendo regulado por um balanço entre moléculas pró e anti angiogénicas. Assim, de modo a iniciar este processo, as células tumorais produzem sinais extracelulares pró-angiogénicos, como por exemplo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), formando-se um sistema vascular estruturalmente e funcionalmente anormal, desorganizado e dilatado, com um fluxo sanguíneo caótico e variáveis zonas de hipoxia (Carmeliet and Jain 2000; Jiang and Liu 2010). Apesar da vascularização do tumor não ser completa, a que ocorre é o suficiente para permitir um aumento da proliferação celular que irá favorecer o aparecimento de novos subtipos celulares com um fenótipo maligno (figura 1.3). Assim o tumor passa a crescer muito mais rapidamente começando a comprimir tecidos adjacentes e eventualmente metastizar (Ruddon 2007). O potencial metastático de cada tumor está relacionado com a capacidade de invasão de uma subpopulação de células e a aptidão que essas células têm de se estabelecer noutro local do organismo. Assim as células tumorais podem atingir outro local do corpo, diretamente invadindo cavidades corporais, como por exemplo o espaço peritoneal ou podem criar metástases noutros locais, por invasão de vasos sanguíneos ou linfáticos (figura 1.3). Tanto a nível molecular como a nível celular a criação de metástases é idêntica à transição epitélio-mesénquima que ocorre na embriogénese: as células tumorais começam por ter uma redução na adesão intercelular, devido à menor expressão de E-caderinas, deixando de ter a forma cuboide típica de um epitélio. Isto leva ao destacamento destas células do tumor primário que passam a adquirir um fenótipo móvel. No estroma começam a expressar metaloproteínases na sua superfície, promovendo a degradação da matriz extracelular. Quando estas células móveis atingem vasos sanguíneos iniciam um processo denominado de intravasão, ou seja, as células tumorais entram nos vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos. Na circulação, as células precisam sobreviver até atingirem um local onde conseguem aderir ao vaso sanguíneo e sair deste processo denominado de extravasão. No novo tecido, as células têm de começar a proliferar e manter este crescimento formando uma micrometástase pré-angiogénica (figura 1.3). De forma a tornar-se macroscópico tem de desenvolver vasos sanguíneos para conseguir manter o seu crescimento (Weinberg 2013; Wirtz, Konstantopoulos, and Searson 2011; Chambers, Groom, and MacDonald 2002).

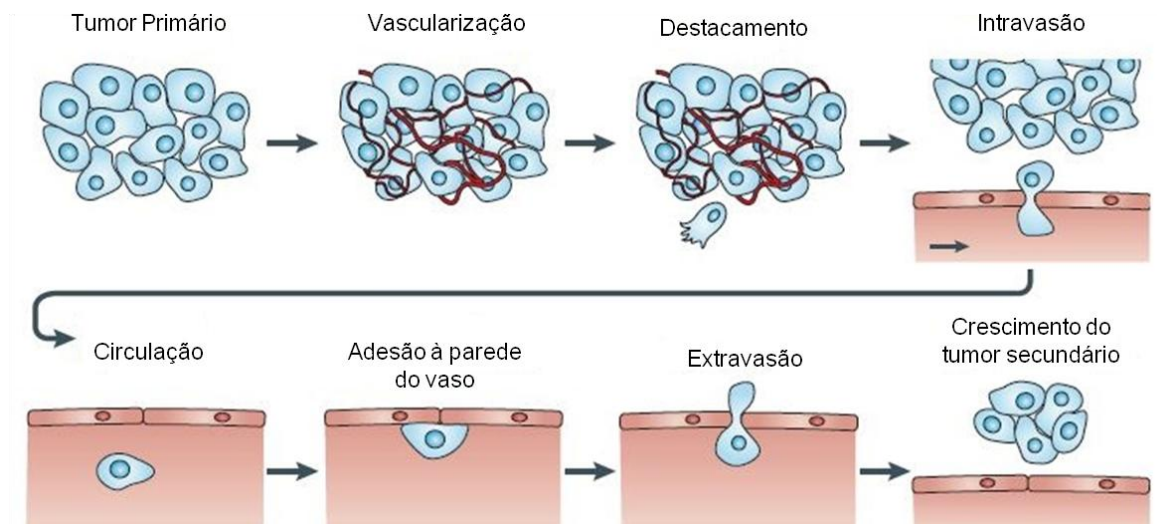


Figura 1.3 - Representação dos principais passos no processo metastático. (Adaptado de Wirtz 2011).

1.4.2. Regulação do ciclo celular

Nos eucariotas, as células dividem-se quando um determinado estímulo, como fatores de crescimento ou hormonas (sinais mitogénicos), ativam a divisão celular. A progressão do ciclo celular passa por quatro fases distintas: G₀/G₁, S, G₂ e M sendo este um processo altamente organizado e regulado que assegura uma duplicação correta do material genético e da célula. A passagem pelas diferentes fases é controlada por várias cinases dependentes de ciclinas (CDK). A atividade das CDK requer a ligação da ciclina complementar e da ocorrência de fosforilação num local específico. Esta atividade é fortemente controlada: é induzida por sinais mitogénicos e pode ser inibida pela ativação dos checkpoints do ciclo celular em resposta a um dano ao DNA (Otto and Sicinski 2017).

Em adulto, a maioria das células dos tecidos encontra-se numa fase estacionária do ciclo celular, nomeadamente na fase G₀, sendo que esta fase pode ser transiente ou permanente. Se for transiente, as células reentram no ciclo celular e diz-se que estão na fase G₁. Os complexos: ciclina-D – CDK4, ciclina-D – CDK6, ciclina-E – CDK2 e ciclina-A – CDK2 regulam a progressão do ciclo pelas diferentes fases (figura 1.4). A proteína retinoblastoma (Rb) é um substrato crucial dos complexos ciclina – CDK, sendo sequencialmente fosforilada por estes e dependendo do local de fosforilação pode dar continuidade ao ciclo ou bloqueá-lo em G₁. A proteína Rb pode ligar-se a proteínas da família E2F o que inativa a síntese do DNA, bloqueando a progressão do ciclo para a fase S. De modo a ocorrer a progressão do ciclo celular, a proteína Rb é hiperfosforilada o que a impede de ligar com as proteínas E2F, pelo que a célula entra na fase S (onde ocorre a duplicação do material genético). A progressão do ciclo da fase G₂ para a M é regulada pela ciclina-B – CDK1. Este complexo está inativo durante a fase G₂ devido à fosforilação da CDK1 pelas proteínas WEE1 (do inglês: *Wee1-like protein kinase*) e Myt1 (do inglês: *Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase*). Por fim, o ciclo avança para a mitose quando o complexo ciclina-B – CDK1 é ativado pela fosfatase CDC25C (Otto and Sicinski 2017; Dickson 2014; Stewart, Westfall, and Pietenpol 2003).

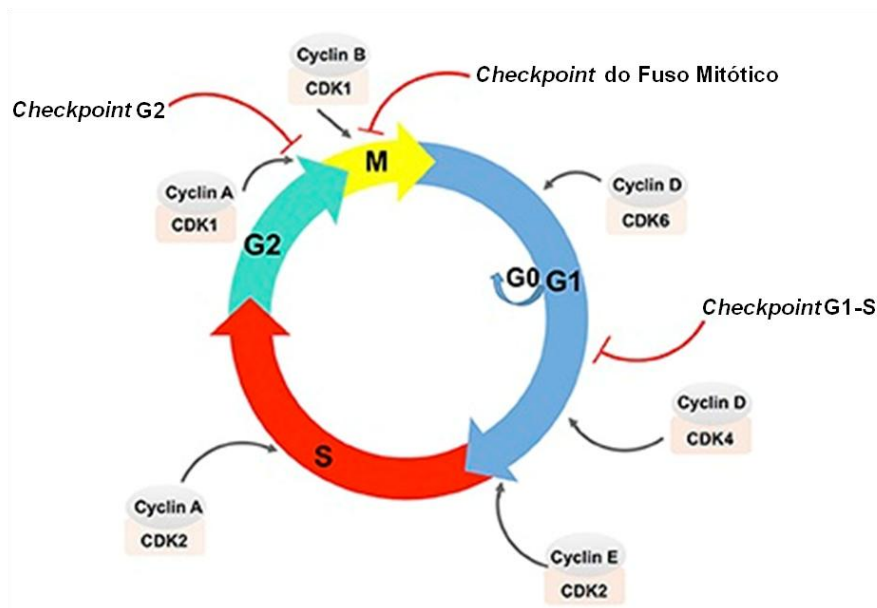


Figura 1.4 - Representação das fases do ciclo celular e dos complexos CDK/ciclinas que são ativados nas respectivas fases, assim como os *checkpoints* envolvidos na regulação do ciclo celular. (Adaptado de Otto 2017).

O controlo do ciclo celular é feito principalmente em três *checkpoints*, mecanismos que foram desenvolvidos pelas células eucariotas e retêm a célula de progredir no ciclo celular em caso de erros. Assim as células podem ser retidas transientemente nos *checkpoints* do ciclo celular e reparar o dano celular ou, se este dano for irreparável é ativada a morte celular programada. O *checkpoint* G1-S inibe as células na fase G1 do ciclo (Figura 1.4). Quando as células são expostas a agentes genotóxicos a transcrição do inibidor p21 é ativada pelo fator de transcrição p53 (do inglês: *cellular tumor antigen p53*). O p21 liga-se e inativa o complexo ciclina-E – CDK2 o que resulta na hipofosforilação da proteína Rb, com o consequente bloqueio do ciclo celular. O *checkpoint* G2 irá bloquear as células em G2 (Figura 1.4), impedindo a progressão para a mitose. Neste caso, quando ocorre um dano ao DNA as proteínas ATM (do inglês: *ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (do inglês: *ataxia telangiectasia and Rad3-related*) impedem a progressão do ciclo celular, por inibição da CDK1. Por fim, no *checkpoint* do fuso mitótico (Figura 1.4) é monitorizada a ligação entre os microtúbulos que formam o fuso e os cromossomas. No caso de erros é atrasada a segregação dos cromossomas até que o erro no fuso mitótico seja corrigido (Barnum and O'Connell 2014; Ruddon 2007).

No cancro existem alterações fundamentais na regulação da divisão celular que resultam numa proliferação celular sem controlo. Em células normais os produtos dos proto-oncogenes atuam em diferentes níveis ao longo das vias que estimulam a proliferação celular, e assim, quando mutados, promovem um aumento na divisão celular. Quando os genes supressores de tumores (como *RB* e o *TP53*) são mutados, essa mutação resulta em proteínas disfuncionais, que levam a uma incapacidade por parte da célula de bloquear a progressão do ciclo celular (Vermeulen, Bockstaele, and Berneman 2003).

1.4.3. Mecanismos de Morte Celular

Durante muitos anos, a comunidade científica pensava que o crescimento descontrolado observado em tumores era devido, unicamente, a uma perda de controlo sobre a divisão celular. No entanto, a taxa de crescimento dos tumores não se correlacionava com o rácio de divisão celular observado. Assim, esta observação sugeriu que o rácio de morte celular, bem como outros fatores, poderiam desempenhar um papel igualmente importante no crescimento tumoral (Ruddon 2007).

A morte celular programada requer uma interação complexa entre três importantes processos: apoptose, necrose e autofagia. Estas três formas de morte celular invariavelmente decidem o destino celular: onde a apoptose e a necrose contribuem sempre para a morte celular, a autofagia pode induzir a morte da célula, mas também ter um papel onde permite a sua sobrevivência (Ouyang et al. 2012). Estas formas de morte celular programada são facilmente distinguidas por diferenças morfológicas e bioquímicas. Na apoptose a célula começa por perder contacto com as células vizinhas e a diminuir o seu volume, adquirindo um formato redondo. O citoplasma torna-se mais denso e os organelos compactados, enquanto no núcleo a cromatina condensa e agrega. Ocorre a fragmentação do núcleo e a membrana plasmática começa a formar vesículas com o material celular no seu interior. Estas vesículas acabam por se separar formando os corpos apoptóticos que vão ser eliminados por macrófagos. A morte celular por necrose sempre foi considerada um processo acidental e incontrollável. Este é o caso quando a célula é sujeita a uma hipóxia severa, temperaturas extremas ou pressões mecânicas. No entanto, foram descobertos mediadores chave (como a cinase RIP, do inglês: *receptor-interacting protein*) que induzem este processo quando ativados. Assim, quando esta morte é induzida, as células perdem a integridade da membrana, com a consequente perda das estruturas celulares e aumento do volume dos organelos. Todo o material intracelular é libertado para o meio extracelular levando a uma resposta inflamatória por parte do sistema imunitário. A autofagia é um mecanismo catabólico de regulação onde proteínas celulares e organelos são sequestrados em vesículas que iram fundir com lisossomas para serem digeridos pelas hidrólases lisossomais. É um mecanismo crucial na resposta a *stress* intra- e extracelular, e em certas circunstâncias pode levar à sobrevivência da célula. No entanto se existir uma sobre-ativação da autofagia a célula acabará por morrer (Ouyang et al. 2012; Jain et al. 2013).

1.4.3.1. Apoptose

A apoptose é um processo de *suicídio* celular com gasto de energia, essencial na manutenção da homeostasia do organismo. Pode ser ativada por uma variedade de estímulos externos ou internos. Um estímulo externo irá induzir a apoptose pela ativação de recetores de morte que estão na superfície da célula. Um estímulo interno induz a apoptose principalmente pela via da mitocôndria. Assim dependendo do estímulo poderemos ter apoptose extrínseca ou intrínseca, respetivamente (figura 1.5) (Jain et al. 2013). Independentemente do estímulo, este tipo de morte celular irá convergir na ativação de caspases. Estas proteases propagam o sinal apoptótico através da clivagem de proteínas celulares chave, como por exemplo poli(ADP-ribose) polimerase, actina e laminas (Vermeulen, Van Bockstaele, and Berneman 2005; Weinberg 2013).

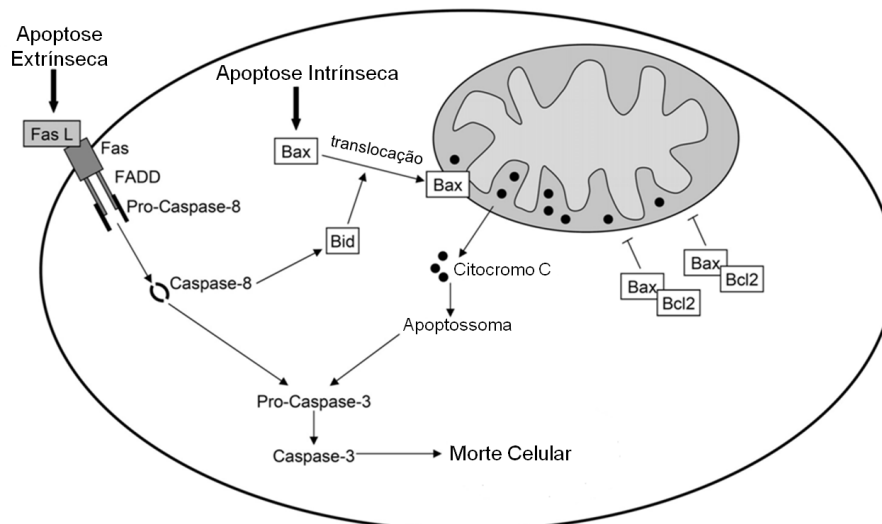


Figura 1.5 – Representação do processo de morte celular por apoptose estando apresentadas as vias extrínseca e intrínseca e as principais moléculas intervenientes nos dois processos. (Adaptado de Bruin 2008).

1.4.3.1.1. Apoptose Extrínseca

Os recetores que ativam a via extrínseca localizam-se na membrana plasmática e pertencem à superfamília de recetores *tumour necrosis factor* (TNF). Os recetores desta família, que ao serem ativados por fatores externos vão induzir apoptose, são por exemplo o recetor FAS (figura 1.5), recetor TNF-1 ou recetor de morte-3. Quando um ligando se associa a um destes recetores ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas. Os recetores contêm um domínio citoplasmático que interage com as proteínas adaptadoras formando um complexo. Este complexo contém um domínio efetor de morte que recruta a procaspase-8 para o mesmo. Neste, a procaspase-8 é ativada proteoliticamente na caspase-8, ficando enzimaticamente ativa. Por sua vez esta irá ativar caspases efetoras. Por exemplo, a caspase-8 cliva diretamente a procaspase-3, ativando esta caspase efetora. A Caspase-8 pode também clivar a proteína Bid (figura 1.5). Esta proteína clivada desloca-se para a mitocôndria, provocando a libertação do citocromo C e consequentemente levando à ativação da caspase-9 (Ichim and Tait 2016; Ghavami et al. 2009).

1.4.3.1.2. Apoptose Intrínseca

Na via intrínseca (ou via mitocondrial) a ativação das caspases está relacionada com a permeabilização da membrana mitocondrial. Esta via é modulada pelo rácio entre as proteínas pró-apotóticas e anti-apoptóticas da família de proteínas Bcl2. Nesta família existem proteínas anti-apoptóticas como por exemplo BCL-2 e BCL-X, as quais participam na prevenção da apoptose pois limitam a permeabilização da membrana mitocondrial, mantendo a sua integridade. Contrariamente a estas, existem proteínas pro-apoptóticas como BAX e BAK. Assim, quando esta via é ativada, a proteína BAX insere-se na membrana mitocondrial levando à libertação do citocromo C para o citoplasma (Bruin et al. 2008). O citocromo C de seguida liga-se à APAF-1, os quais juntos com (d)ATP formam um complexo chamado apoptossoma, que irá especificamente ativar a caspase-9.

Este evento dará início a uma cascata proteolítica que resulta na ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7 (figura 1.5). Além do citocromo C, a mitocôndria liberta várias outras proteínas como a Smac (do inglês: *Second mitochondria-derived activator of caspase*) ou HtrA2 (do inglês: *High temperature requirement protein A2*) que iram promover a ativação de caspases ou atuar como efetores de uma forma independente das caspases (Jain et al. 2013; Ghavami et al. 2009).

Esta via é muitas vezes ativada pela proteína p53 em resposta a um dano no DNA. O p53 é um fator de transcrição nuclear que promove a apoptose intrínseca por ativação de várias proteínas pró-apoptóticas, como por exemplo a Bax, onde promove tanto a sua transcrição como ativação (Jain et al. 2013).

1.4.3.2. Autofagia

A autofagia é um processo que ocorre nas células em baixos níveis. Contribui para a eliminação de organelos velhos ou danificados e está envolvida na renovação de proteínas com um grande período de vida. Este processo pode ser aumentado por uma variedade de *stress* metabólicos como a falta de nutrientes, dano ao DNA, organelos disfuncionais, agregados de proteínas e vários fármacos antitumorais, sendo que muitos destes têm como alvo o regulador central da autofagia, mTOR. Assim, esta serve como um mecanismo de proteção que facilita a degradação de componentes celulares (S. Fulda and Kögel 2015). Os diferentes passos neste processo são controlados pelas proteínas centrais da autofagia, ATGs (figura 1.6). A biogénese do autofagossoma começa com a formação de uma membrana que isola o organelo a ser degradado. A nucleação da vesícula é promovida pelo complexo macromolecular Beclina-1 que contém a cinase lipídica Vps34 (do inglês: *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*). A elongação da vesícula é regulada por dois sistemas de conjugação de ubiquitina tipo, que envolvem vários tipos de proteínas ATG: i) um complexo proteico contendo ATG5 (ATG12/ ATG16); ii) a conjugação de uma fosfatidiletanolamina com LC3-I mediada pelas ATG7/ATG3, levando à formação da LC3-II, que é inserida na membrana do autofagossoma. Após o fecho da vesícula, o autofagossoma maduro funde-se com um lisossoma formando o autofagolisossoma, onde o conteúdo vesicular é digerido por proteases (figura 1.6) (Shimizu et al. 2014; S. Fulda and Kögel 2015; Cicchini, Karantza, and Xia 2015). Uma vez ativada de forma persistente, onde a célula fica sem organelos e proteínas essenciais, a autofagia pode levar à ativação da morte celular independente de caspases. No entanto em células onde ocorre uma autofagia persistente muitas vezes existe apoptose com ativação de caspases mas também necrose com o aumento de volume de organelos e a rutura da membrana plasmática (Amaravadi and Thompson 2007).

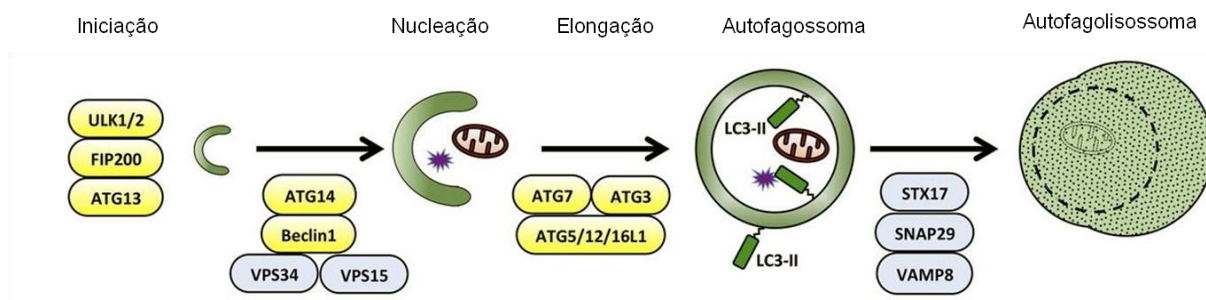


Figura 1.6 - Representação dos passos e moléculas envolvidos no processo de autofagia. (Adaptado de Cicchini 2015).

1.5. Terapêutica em Cancro

O estudo das bases moleculares do cancro sempre trouxe consigo a promessa de proporcionar uma terapêutica mais refinada e efetiva. No entanto, o cancro continua a ser um importante problema de saúde em todo o Mundo. Estima-se, que com o estilo de vida das populações e as terapias utilizadas atualmente, no ano de 2035 morram, devido a esta doença, 14,6 milhões de pessoas globalmente (AACR 2017).

Os procedimentos terapêuticos aplicados aos pacientes continuam, na sua grande maioria, a ser empíricos variando bastante entre centros médicos. O tratamento depende de uma variedade de fatores individuais que têm em conta as características moleculares do cancro, a sua localização, a extensão da doença e o estado de saúde do paciente. O objetivo final da terapêutica é a destruição de todas as células tumorais com o menor dano possível ao tecido saudável (Luqmani 2008).

Os tratamentos clássicos – cirurgia, radioterapia e quimioterapia – têm demonstrado durante várias décadas serem altamente eficazes em prolongar o tempo de vida do paciente e em erradicar a maioria dos tumores (Weinberg 2013). A cirurgia é a terapia mais eficaz no tratamento de tumores primários e quando usada como tratamento único, cura mais pacientes que qualquer outro tratamento aplicado individualmente. A radiação externa e/ou interna quando aplicada sozinha pode ser curativa numa variedade de tumores. No entanto um uso mais comum da radioterapia é em combinação com a cirurgia e/ou quimioterapia. A quimioterapia utiliza fármacos que têm um efeito citotóxico preferencialmente, mas não exclusivamente, nas células tumorais (Urruticoechea et al. 2010).

1.5.1. Quimioterapia

A quimioterapia pode ser utilizada em diferentes abordagens: como terapia adjuvante, neste caso é aplicado ao paciente após cirurgia, por forma a diminuir o risco de recorrência; como terapia neoadjuvante, onde o paciente é submetido a quimioterapia antes de ser operado a um tumor localizado, numa tentativa de diminuir o seu tamanho; como terapia concomitante, aqui é utilizado a quimioterapia complementada com a radioterapia sem intervenção cirúrgica; ou como terapia paliativa, onde a melhor resposta à terapia é uma diminuição do volume do tumor com a consequente diminuição dos sintomas e/ou prolongamento da vida do paciente (Corrie 2011; Baudino 2015). A

quimioterapia pode ser administrada aos pacientes por via intravenosa, intramuscular e oral. A via utilizada vai depender grandemente das propriedades do fármaco *in vivo* (Corrie 2011).

A grande maioria dos fármacos utilizados funciona interferindo na divisão celular ou na síntese de DNA o que leva à indução da apoptose. Assim como as células tumorais têm as vias de sinalização de crescimento excessivamente ativas tornam-se suscetíveis a uma grande variedade destes tipos de fármacos que têm como alvos moléculas destas vias (Luqmani 2008). Os fármacos quimioterapêuticos podem ser classificados em 5 classes consoante o seu mecanismo de ação (Baudino 2015; Avril, Vauléon, and Chevet 2017):

1. Antimetabolitos – moléculas análogas aos ácidos nucleicos ou aos precursores dos ácidos nucleicos, que podem ser incorporados no DNA ou prevenir a normal biossíntese das purinas e pirimidinas, acabando por interferir com a replicação do DNA. São exemplos desta classe a mercaptopurina e o 5-fluorouracilo.
2. Agentes Alquilantes – moléculas que modificam as bases do DNA ou que causam quebras no DNA ao adicionar grupos alquil, induzindo mutações e/ou que criam ligações cruzadas entre átomos do DNA impedindo a separação da cadeia dupla. Exemplos desta classe são a cisplatina e a mitomicina C.
3. Agentes Intercalantes – moléculas que se ligam aos sulcos da dupla hélice do DNA, o que interferem com a atividade da polimerase durante a replicação/transcrição. Exemplos são a doxorubicina e a epirubicina.
4. Inibidores de topoisomerases – moléculas que vão bloquear a replicação por inibição da atividade de topoisomerases de resolução de superenrolamentos da dupla cadeia de DNA. Por exemplo o etoposídeo e a camptotecina.
5. Inibidores Mitóticos – moléculas que afetam os microtúbulos do fuso mitótico. Estes inibidores previnem a polimerização dos monómeros de tubulina. Como exemplos temos o paclitaxel e o docetaxel.

Os processos que governam a proliferação celular são comuns às células saudáveis e às células tumorais, assim ambas as populações celulares vão ser suscetíveis aos danos causados pela maioria destes fármacos (Baudino 2015). No entanto existe uma maior seletividade para com as células tumorais, pois estas têm uma elevada taxa proliferativa e/ou defeitos na sua capacidade de reparar danos no DNA e por isso não conseguem combater o efeito citotóxico do fármaco. O objetivo final da quimioterapia é conseguir um dano máximo às células tumorais enquanto se aceita um ligeiro grau de toxicidade às células saudáveis (Corrie 2011).

Em alguns casos, as células tumorais podem não responder ao tratamento com alguns tipos de fármacos (resistência primária ou intrínseca) ou como acontece num elevado número de casos, um paciente que começa por responder à terapia, acaba por, numa fase mais tardia, demonstrar uma perda de resposta que resulta no crescimento do tumor (resistência adquirida por exposição ao fármaco) (Avril, Vauléon, and Chevet 2017). Assim uma grande limitação da quimioterapia é a resistência intrínseca ou adquirida das células tumorais. Os mecanismos subjacentes a essa

resistência são na maioria dos casos devido a: i) uma redução no influxo do fármaco, ii) um aumento na destoxificação intracelular, iii) uma incapacidade de ativação do fármaco (exemplo: caso de pró-fármacos), iv) uma alteração dos seus alvos, v) um aumento dos mecanismos de reparação do DNA ou vi) um aumento de atividade de bombas de efluxo (Corrie 2011; Avril, Vauléon, and Chevet 2017).

Uma das formas de ultrapassar o problema da resistência foi através do desenvolvimento de protocolos com múltiplos fármacos em que se combinam fármacos com modos de ação distintos, mas complementares (Pedrosa et al. 2018). Assim quando por exemplo se juntam três fármacos com três distintos modos de ação a probabilidade de pré-existirem populações celulares no tumor que são resistentes simultaneamente aos três fármacos é bastante baixa. De facto, o que se observa clinicamente é uma redução drástica de certos tumores. Com esta modalidade de tratamento os efeitos citotóxicos são menores pois como os fármacos atuam de forma aditiva é necessário uma dosagem terapêutica menor de cada um individualmente, sendo necessários menos ciclos de tratamento o que acaba por diminuir a incidência da resistência (Mokhtari et al. 2017).

Assim, nos últimos anos tem-se verificado a necessidade de desenhar e sintetizar novas moléculas que demonstrem um efeito terapêutico máximo quer *in vitro*, quer *in vivo*, tendo a química organo-/inorgano- metálica adquirido relevância neste campo (Pedrosa et al. 2018; Ndagi, Mhlongo, and Soliman 2017).

1.5.1.1. Compostos metálicos no tratamento do cancro

Existem evidências do uso medicinal de metais desde à quase 5000 anos. Como exemplo, encontra-se o uso terapêutico do ouro e cobre por parte das civilizações Egípcia e Chinesa para o tratamento de doenças como a sífilis. No entanto, só a partir da descoberta da cisplatina é que a comunidade científica compreendeu o total impacto que os compostos metálicos poderiam ter no tratamento do cancro (Frezza et al. 2010; Ndagi, Mhlongo, and Soliman 2017). A partir desse marco, o campo da química inorgânica medicinal passou a receber considerável atenção devido ao desenvolvimento de agentes antitumorais contendo centros metálicos.

A descoberta da cisplatina é um marco incontornável no uso de metalofármacos em quimioterapia. Esta deu-se em 1967 (Rosenberg et al. 1967), quando Rosenberg, ao estudar o efeito do campo elétrico no crescimento bacteriano, observou que as bactérias aumentavam de volume, mas não se dividiam. Após um estudo intensivo deste fenómeno, Rosenberg e colaboradores compreenderam que o efeito se devia à formação de cis-diclorodiamineplatina(II), nomeadamente cisplatina, pelos elétrodo de platina. (Allardyce and Dyson 2016).

A entrada da cisplatina na célula dá-se por difusão passiva ou por transporte ativo, sendo que a sua toxicidade deriva da formação de ligações covalentes cruzadas entre os nucleótidos do DNA (*cross-links*). Estas ligações, que vão causar uma distorção significativa na dupla hélice, levam à inibição da replicação e transcrição (Trudu et al. 2015). A descoberta deste fármaco aconteceu numa altura em que o desenvolvimento de fármacos para quimioterapia estava baseado em pequenas moléculas orgânicas, pelo que a cisplatina, sendo um complexo inorgânico, veio revolucionar a área com uma

taxa de sucesso de praticamente 100% de cura no caso do cancro do testículo, quando descoberto numa fase inicial. Esta é também aplicada ao tratamento do cancro cervical, do ovário, cabeça e pescoço, bexiga e linfomas (Allardyce and Dyson 2016; van Rijt and Sadler 2009). Isto levou a que nas últimas décadas vários análogos da cisplatina, como a carboplatina, a oxaliplatina, a nedaplatina ou a lobaplatina fossem sintetizados para uma utilização em quimioterapia, sendo que, os últimos dois estão aprovados para uso clínico unicamente no Japão e na China, respetivamente (Muhammad and Guo 2014).

A cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (figura 1.7) são fármacos utilizados em cerca de 50-70% de todas as terapias antitumorais, tendo demonstrado uma atividade terapêutica notável numa série de tumores sólidos (Allardyce and Dyson 2016). No entanto, apesar do sucesso destes fármacos com base em platina, existem grandes desvantagens associadas ao seu uso: são eficientes num número limitado de tumores, alguns tumores têm resistência intrínseca ou adquirida. Adicionalmente é ainda habitual, verificarem-se efeitos secundários severos e limitantes, como a neuro-, hépato- e nefrotoxicidade (van Rijt and Sadler 2009).

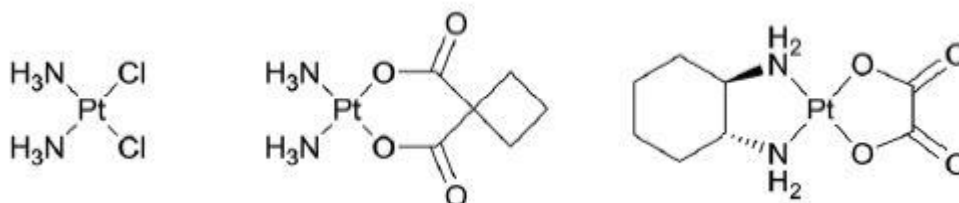


Figura 1.7 - Estrutura química da platina, carboplatina e oxaliplatina (da esquerda para a direita). (Retirado de Allardyce 2016).

Em suma, devido não só ao sucesso da cisplatina, mas também devido às suas desvantagens, existe uma demanda cada vez maior de compostos com diferentes centros metálicos para o tratamento do cancro. Isto deve-se em grande medida ao nível de citotoxicidade que apresentam *in vitro*, que é explicado pelas características únicas dos metais, como a atividade de oxidação-redução, modos de coordenação variáveis e reatividade contra substratos orgânicos. Assim, a substituição de ligandos ou a modificação de estruturas químicas já existentes levou à síntese de uma grande variedade de compostos com uma maior citotoxicidade específica para as células tumorais e melhor perfil farmacocinético (Ndagi, Mhlongo, and Soliman 2017).

1.5.1.1.1. Potencial da Prata como centro metálico em compostos antitumorais

Complexos de prata têm sido conhecidos desde há muito tempo pela sua atividade antimicrobiana sendo bastante utilizados no tratamento de feridas, em casos de queimadura e em aplicações médicas: no revestimento de válvulas artificiais e de cateteres como forma de reduzir ou prevenir infeções (Ndagi, Mhlongo, and Soliman 2017; Medvetz et al. 2008). No passado, os complexos de prata não receberam muita atenção comparativamente a outros metais para a produção de fármacos antitumorais. No entanto, recentemente, estes complexos atraíram bastante interesse, principalmente

devido ao facto de complexos de prata terem exibido uma citotoxicidade superior à cisplatina em certas linhas tumorais, possuindo contudo uma toxicidade relativamente baixa em linhas celulares saudáveis, e maior seletividade para com as linhas celulares tumorais (Ndagi, Mhlongo, and Soliman 2017).

A toxicidade da prata nas bactérias está bem estudada e documentada. No entanto, no que se refere ao corpo humano, esta toxicidade aparenta ser reduzida. Isto pressupõe-se pelo facto de este metal, apesar de ser observado em tecidos humanos como consequência da bioacumulação, não apresenta um papel biológico no organismo. Isto indica que o corpo humano consegue tolerar a presença da prata, em doses reduzidas, sem qualquer efeito tóxico. Esta é uma das grandes vantagens deste metal em relação a outros, podendo o seu potencial antitumoral ser explorado na prática clínica com a expectativa de resultar em efeitos secundários menos acentuados (Medici et al. 2016). No entanto a prata, principalmente iões de prata livre, em doses elevadas, podem causar efeitos adversos, tais como uma descoloração azul acinzentada permanente da pele (argiria) ou dos olhos (argirose). São observados ainda efeitos tóxicos tanto no fígado como nos rins, bem como irritações nos olhos, na pele e nos tratos respiratório e intestinal (Medvetz et al. 2008; Prabhu and Poulouse 2012).

As propriedades antimicrobianas e, potencialmente, antitumorais dos complexos de prata devem-se ao seu peculiar mecanismo de ação. Na verdade, apesar das vias de ação não terem sido completamente elucidadas, a ação antimicrobiana da prata pode ser exercida de vários modos: i) permeabilização da célula por ligação a enzimas essenciais da membrana ou por destruição da integridade da parede celular devido à remoção de eletrões deste componente, ii) alterações no metabolismo celular através da interação com enzimas, desnaturação de proteínas, inibição da respiração bacteriana ou oxidação do ATP, iii) indução de espécies reativas de oxigénio (ROS). Assim, em princípio, estas ações da prata em células bacterianas podem também ocorrer nas células tumorais. Em relação à interação da prata com os ácidos nucleicos esta parece ser feita preferencialmente por ligações às bases (por oposição aos grupos fosfato), contrariamente ao mecanismo observado nos compostos derivados de platina (Medici et al. 2016).

A atividade dos complexos de prata contra bactérias e células tumorais está estritamente ligada à sua solubilidade em água, estabilidade, lipofília, capacidade de oxidação-redução e o rácio de libertação dos iões prata. Todas estas propriedades podem ser modeladas através da escolha de diferentes ligandos (Medici et al. 2016).

1.5.1.1.2. Ligando Tris(pirazolil)metanosulfonato em compostos antitumorais

Como já foi referido, no design de novos metalofármacos potencialmente ativos, para além da natureza do metal escolhido, é de extrema importância optar por um ligando cujas características potenciem a estabilidade cinética e termodinâmica, solubilidade e lipofilicidade desejada no composto (Martins and Pombeiro 2016).

No ano de 1966, Trofimenko, introduziu um novo ligando designado hidrotris(pirazolil)borato (abreviado de “tp”) (Trofimenko 1966) que rapidamente ocupou um lugar de destaque na química de coordenação. Isto deveu-se à sua capacidade de se comportar como um dador de azoto tripodal tornando-se, por sua vez, um quelante versátil de azoto (Kläui et al. 2000). Esta versatilidade deve-se à fácil modificação estérica e eletrônica do centro metálico, por variações ou modificações no ligando de modo a ajustar a estabilidade, a inércia e a reatividade do complexo metálico (Gawryszewska and Smolenski 2014). Devido a estas qualidades, já foram sintetizados complexos com este ligando e com a maioria dos metais da tabela periódica. No entanto, apesar destas vantagens, o ligando tp tem as desvantagens de ser insolúvel em água e de ocorrer hidrólise da ligação B-N (Kläui et al. 2000). Por isso mesmo, com base no ligando tp foi mais tarde sintetizado pela primeira vez, por Kläui e colaboradores em 1999 (Kläui et al. 2000), um novo ligando flexível denominado de tris(pirazolil)metanosulfonato (figura 1.8), “tpms”. Este ligando monoaniônico, em vez de um grupo de hidreto de boro, tem o grupo metanosulfonato que dá ao ligando uma maior estabilidade na hidrólise, aumenta a sua solubilidade em solventes polares e mantém a estrutura numa grande variabilidade de pH em soluções aquosas (Kläui et al. 2000, 2001).

Este ligando pertence à classe dos escorpionatos. O termo deve-se ao seu modo de coordenação, onde três átomos de azoto, cada um originário de um grupo pirazole, têm a capacidade de ocupar três posições adjacentes da esfera de coordenação do centro metálico (figura 1.8).

Mais precisamente, o termo escorpionato tem sido utilizado para descrever o intercâmbio entre o modo de coordenação bidentado e tridentado, que está no centro da versatilidade química e estrutural de muitos complexos metálicos com estes tipos de ligandos (Gawryszewska and Smolenski 2014; Martins and Pombeiro 2016). Assim, no caso do ligando tpms outra das suas vantagens é a possibilidade de coordenar de forma tridentada ou bidentada. Na coordenação tridentada pode formar as ligações N,N,N ou N,N,O enquanto na coordenação bidentada pode ligar por N,N ou N,O (Papish et al. 2006).

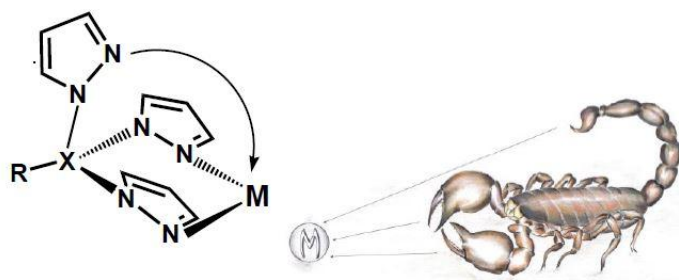


Figura 1.8 - Estrutura de um escorpionato. Este termo provém da interação entre o centro metálico (M) e os tris(pirazolil)metanosulfonato em geral, interação essa que lembra as pinças e cauda de um escorpião. (Retirado de Gawryszewska 2014).

1.6. Genética e Tratamento do Carcinoma do Ovário

Como em todos os cânceros, o risco de desenvolver câncer do ovário aumenta com a idade e no caso de existir uma história familiar de câncer da mama ou ovário o risco também aumenta sendo que estes casos, muitas vezes, envolvem mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (Ruddon 2007). No entanto, essas mutações também são comuns em mulheres com câncer dos ovários que não possuam uma história familiar de câncer. Os portadores da mutação no gene *BRCA1* têm um risco de 44% de desenvolver câncer dos ovários aos 70 anos, enquanto que os portadores da mutação no gene *BRCA2* têm 27% (Reid, Permuth, and Sellers 2017). As alterações genéticas observadas durante a progressão da doença são a sobreexpressão do Her2/neu e *c-myc*. A ativação da *K-ras* é muitas vezes identificada e mutações no *p53* ocorrem em 50% dos casos. Esta doença parece evoluir através de múltiplas alterações cromossômicas (Ruddon 2007). O tratamento padrão aplicado no caso de o câncer ser detectado num estado inicial é a cirurgia seguida de quimioterapia se necessário. Quando detectado em estados tardios ainda se recorre à cirurgia, sendo esta mais agressiva envolvendo a remoção do tumor primário e de todas as metástases, mas a quimioterapia já é aplicada como neoadjuvante de forma a reduzir a massa tumoral antes da cirurgia. Nesta fase a quimioterapia é feita à base de compostos de platina (Bohra 2012). Após a cirurgia os pacientes são sujeitos a quimioterapia sistêmica recorrendo-se ao uso da carboplatina e do paclitaxel. No entanto a maioria dos pacientes com estados avançados da doença apesar da cirurgia e quimioterapia apresentam recorrência do câncer após 12 meses a 3 anos. Nestes casos o tratamento principal é a quimioterapia paliativa como forma de aliviar os sintomas e aumentar o tempo de vida do paciente. A quimioterapia selecionada nestes casos vai depender se o paciente demonstra algum tipo de resistência aos fármacos utilizados (Bohra 2012). Assim continua a ser extremamente importante o desenvolvimento de fármacos para o tratamento deste tipo de câncer.

1.7. Contexto e Motivação

Os fármacos utilizados atualmente em quimioterapia apresentam duas desvantagens principais: causam toxicidade nos tecidos saudáveis e as células tumorais acabam por desenvolver resistência a estes compostos. Assim, existe uma necessidade de se desenvolverem novos fármacos com uma maior citotoxicidade para com as células tumorais e reduzidos efeitos secundários (Silva et al. 2014).

O presente estudo teve o objetivo de analisar o potencial citotóxico de um novo complexo de prata, tris(pirazolil)metanosulfonato de prata I. Esta classe de ligandos em complexos metálicos já demonstrou funcionar como um potente agente citotóxico *in vitro*, (Niesel et al. 2008), assim como muitos complexos de prata (Medici et al. 2016). Por outro lado, como compostos de prata são geralmente pouco solúveis em água, a escolha do ligando tpms foi no sentido de potenciar a solubilidade do complexo metálico e assim aumentar o seu potencial citotóxico.

Após a análise do potencial citotóxico do complexo, o objetivo deste trabalho passa por determinar quais as vias de morte celular ativadas pelo complexo de prata, bem como o seu potencial citostático,

geração de ROS e alvos biológicos sendo feita uma análise proteómica comparativa com o fim de se determinar alterações à expressão proteica numa linha celular derivada do carcinoma de ovário.

Este trabalho permitirá obter informação crucial sobre a ação *in vitro* do complexo de prata em estudo e ainda sendo os resultados promissores tornará possível avançar para ensaios em modelos biológicos mais complexos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Composto em Estudo

O complexo metálico de prata estudado, tris(pirazolil)metanosulfonato de prata I, designado por Ps35, foi sintetizado e caracterizado no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico (Universidade de Lisboa). Este complexo é constituído pelo ião prata (Ag) associado ao ligando tris(pirazolil)metanosulfonato (tpms) (figura 2.1) formando um polímero de coordenação 1D onde a estrutura do complexo é formada por N repetições da unidade Ag_2tpms_2 .

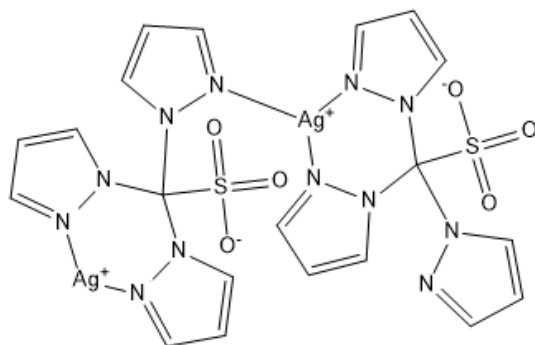


Figura 2.1 - Estrutura do composto Ps35.

As características do composto Ps35 encontram-se descritas na tabela abaixo (tabela 2.1). Tanto o composto sólido como após ser solubilizado foi armazenado à temperatura ambiente protegido da luz.

Tabela 2.1 - Propriedades do composto utilizado no presente estudo: fórmula química, massa molar (o valor utilizado no decorrer do trabalho é referente à unidade assimétrica do composto Ag_2Tpms_2) e solvente.

Composto	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	Solvente
Ps35	$\text{Ag}_2\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_{12}\text{O}_6\text{S}_2$	802,30*	Sulfóxido de Dimetilo (DMSO)

O DMSO é um solvente orgânico, polar e aprótico muito utilizado para solubilizar fármacos hidrofóbicos devido à sua natureza anfipática (Galvao et al. 2014). Dada a baixa solubilidade em água do composto Ps35, neste trabalho foi utilizado o DMSO como solvente. Assim, em todos os ensaios biológicos foram preparadas soluções *stock* do composto Ps35 em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a uma concentração de 5 mM. Após a dissolução do composto, as soluções foram sujeitas a um banho de ultrassons durante 5 minutos (sonicador Elma, D-78224 Singen/Htw, Alemanha). Aquando da adição às células, foram realizadas diluições seriadas em meio completo, partindo da solução *stock* até à concentração pretendida. Por uma questão de toxicidade celular, a concentração de DMSO usada em cada ensaio biológico foi de 0,1 % (v/v).

2.1.1. Solubilidade do composto

De modo a estudar qual a melhor forma de armazenamento e a possibilidade de reutilização de uma solução *stock* do composto em DMSO, a solubilidade deste foi analisada por espectroscopia de UV-Visível (espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240, Quioto, Japão)) numa gama de comprimentos de onda de 230 a 800 nm e utilizando-se uma cuvette de quartzo com 1 cm de percurso ótico. Primeiramente, foram analisadas duas concentrações de Ps35 (25 µM e 50 µM) e de seguida duas condições de armazenamento: 4 °C e temperatura ambiente (Tamb), durante 24 horas. Foi sempre utilizado como comparação o espectro de absorção do composto imediatamente após ser solubilizado em DMSO (referida como condição a fresco).

2.2. Linhas Celulares Humanas

2.2.1. Características

Neste trabalho prático foi analisado o potencial citotóxico do composto Ps35 em duas linhas tumorais humanas, nomeadamente na linha celular A2780 (linha proveniente de um carcinoma de ovário) e na linha celular HCT116 (proveniente de um carcinoma colorretal). No sentido de se avaliar a citotoxicidade em células não tumorais humanas, foi utilizada uma linha primária de fibroblastos neonatais (provenientes da derme). Todas as culturas celulares foram obtidas da ATCC (ATCC®, *American Type Culture Collection*). Na tabela 2.2 encontram-se discriminadas as linhas celulares utilizadas no decorrer deste trabalho bem como as suas características, nomeadamente a origem, a morfologia celular e o meio de cultura apropriado.

Tabela 2.2 - Linhas Celulares utilizadas neste trabalho prático e as suas características (origem, morfologia celular e meio de cultura). RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); FBS – Soro Fetal Bovino (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); Pen/Strep – Penicilina/ Estreptomicina (antibiótico) (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); MEM – *non-essential amino acid* (Sigma, St. Louis Missouri, EUA).

Linha Celular	Origem	Morfologia	Meio de Cultura % (v/v)
A2780	Carcinoma de Ovário	Epitelial	RPMI; FBS 10%; Pen/Strep 1%; MEM 1x
HCT116	Carcinoma Colorretal	Epitelial	DMEM; FBS 10%; Pen/Strep 1%; MEM 1x
Fibroblastos	Derme neonatal	Células fusiformes, bipolares	DMEM; FBS 10%; Pen/Strep 1%; MEM 1x

2.2.2. Manutenção de culturas celulares

As linhas celulares A2780, HCT116 e fibroblastos foram cultivadas em meio RPMI ou DMEM (Tabela 2.2) suplementados com 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) solução antibiótica Pen/Strep (solução com penicilina a 10000 U/mL, estreptomicina a 10000 µg/mL) e 1x de aminoácidos MEM 100x, sendo os meios suplementados referidos como meio completo. As linhas celulares foram crescidas em frascos de cultura de 75 cm² (SPL Life Sciences, Coreia do Sul). As culturas foram mantidas numa estufa de CO₂ (SANYO CO₂ Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) de humidade relativa.

De forma a manter as culturas celulares com um crescimento exponencial e em monocamada foram realizadas subculturas semanalmente. Assim, quando se atingia uma confluência de cerca de 80 % era feita uma subcultura de forma a evitar a falta de nutrientes e a inibição do crescimento por contacto. Primeiramente é analisado o crescimento celular através do microscópio ótico invertido (Nikon TMS, Nikon Instruments, Tóquio, Japão). De seguida o meio é retirado sendo adiciona 3 mL de TrypLE™ Express (Gibco®, Nova Iorque, EUA), este reagente contém uma enzima recombinante, homóloga à tripsina, que destaca as células aderentes ao frasco de cultura. Após atuar por pelo menos 5 minutos à Tamb o reagente é neutralizado com a adição de um igual volume de meio completo. De seguida a solução é transferida para tubos Falcon de 15 mL (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) sendo centrifugada durante 5 minutos a 700 x g e 20 °C (Sigma 3-16K 10280, Tuttlingen, Alemanha). É descartado o sobrenadante e o sedimento de células é ressuspenso em 1 mL de meio completo.

A contagem de células foi realizada pelo método de exclusão com azul de Trypan (Sigma, St. Louis, EUA). Este método tem por base o corante vital azul de Trypan, que marca células com a membrana plasmática comprometida permitindo identificar células não viáveis, e um hemocitómetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha). Assim faz-se uma solução com 350 µL de meio completo, 100 µL de azul Trypan a 0,2 % (v/v) e 50 µL da suspensão celular recorrendo-se ao microscópio ótico invertido para se realizar a contagem do número de células viáveis. A concentração celular (células/mL) é obtida multiplicando o número de células contadas pelo volume do hemocitómetro (10⁴ mL⁻¹) e pelo fator de diluição (10) a dividir pelo número de quadrantes onde foram contadas células, como está representado na equação 2.1.

$$\text{Equação 2. Erro! Marcador não definido.} \quad N^{\circ} \text{ Células/mL} \\ = \frac{N^{\circ} \text{ Total de Células Contadas} \times 10 \times 10^4}{N^{\circ} \text{ Quadrantes}}$$

Ao aplicar esta equação é possível estimar o volume da suspensão celular a aplicar num novo frasco de cultura de 75 cm² com 13 mL de meio completo. As culturas são mantidas a 37 °C numa atmosfera controlada com 5 % (v/v) CO₂ e 99 % (v/v) de humidade relativa na estufa de CO₂ SANYO CO₂ Incubator.

2.3. Ensaios de citotoxicidade

A avaliação do potencial citotóxico do Ps35 foi conseguida através da medição da capacidade antiproliferativa deste composto *in vitro*. Para tal foram utilizadas as células tumorais A2780 e HCT116. A linha celular de fibroblastos foi utilizada como controlo de citotoxicidade em células normais. Neste ensaio foi utilizado o *Kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA) que contém dois reagentes: MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxymetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio], um sal tetrazólico de coloração amarela, que ao ser reduzido pelo PES (etossulfato de fenazina) forma formazano, uma substância aquosa e solúvel em meio de cultura, de coloração acastanhada e que absorve aproximadamente a 490 nm (Promega Corporation 2012).

Após determinação da concentração celular pelo método de exclusão com azul de *Trypan* (secção 2.2.2) as células foram semeadas numa placa de 96 poços (SPL Life Sciences, Coreia) a uma concentração de $7,5 \times 10^4$ células/mL, durante 24 horas com o intuito de aderirem à placa. Após esse tempo o meio onde se encontravam foi substituído por meio completo contendo o composto Ps35. Numa primeira fase, foi testada nas duas linhas celulares tumorais a gama de concentrações de 0,25-50 μM . De seguida, na linha celular A2780, foi testada uma gama de concentrações de 0,005-0,25 μM e nas linhas celulares HCT116 e fibroblastos testaram-se concentrações entre 2,5-10 μM . Em todos os ensaios foi feito o controlo (veículo) contendo DMSO a 0,1 % (v/v) e o controlo contendo apenas meio completo. Após 48 horas de incubação a viabilidade celular foi medida com a utilização do *Kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante (Promega Corporation 2012). Foi retirado o meio a cada poço onde as células se encontravam e adicionado 100 μL de uma solução colorimétrica que continha o reagente MTS fornecido pelo *kit* e meio completo, numa proporção de 20 μL do reagente/poço para 80 μL meio completo/poço. As células foram de seguida incubadas por 45 minutos a 37 °C, 99 % (v/v) humidade relativa e 5 % (v/v) CO_2 (SANYO CO_2 Incubator, Eletric Biomedical Co.). Após esse período, mediuse a absorvância a 490 nm num leitor de microplacas *Tecan Infinite F200 Microplate Reader* (Tecan, Männedorf, Suíça). A viabilidade celular foi determinada aplicando a equação 2.2.

$$\text{Equação 2. Erro! Marcador não definido.} \quad \text{Viabilidade Celular (\%)} \\ = \frac{\text{Absorvância da Amostra (490nm)}}{\text{Absorvância do Controlo (490nm)}} \times 100$$

Como controlo positivo (redução de viabilidade celular) foi usada a doxorrubicina (DOX) (0,4 μM).

A partir dos valores obtidos de viabilidade celular foi calculado o IC_{50} relativo utilizando o programa GraphPadPrism 6 (Graph Pad Software Inc., San Diego, EUA).

Foi calculado o Índice de Seletividade como forma de avaliar a capacidade antiproliferativa diferencial do composto para com as linhas tumorais face às células normais. O índice de seletividade foi calculado aplicando a equação 2.3.

Equação 2. Erro! Marcador não definido. *Índice de Seletividade*

$$= \frac{IC_{50} \text{ do composto na linha saudável}}{IC_{50} \text{ do composto na linha tumoral}}$$

O composto, quando em solução, pode formar dois subprodutos, nomeadamente óxido de prata e tris(pirazolil)metanosulfonato, o ligando a ele associado. Devido a este facto, foi também analisado o efeito citotóxico de cada um destes produtos individualmente (concentração correspondente ao valor do IC₅₀ do Ps35 nesta linha e 1/10 desse valor) e em conjunto (ambos na concentração correspondente ao valor do IC₅₀ do Ps35) em A2780. O protocolo foi o descrito anteriormente com a utilização do *Kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA).

2.4. Adesão Celular

Como forma de se avaliar a diminuição da adesão celular devido ao composto Ps35, recorreu-se mais uma vez ao método de exclusão por azul de Trypan (secção 2.2.2). Numa placa de 24 poços (SPL Life Sciences, Coreia) foram semeadas células da linha A2780 a uma concentração de 7,5X10⁴ células/mL com uma incubação de 24 horas. Após esse tempo o meio onde se encontravam foi substituído por meio completo contendo o IC₅₀ do composto Ps35 nesta linha celular ou contendo 0,1 % (v/v) DMSO. As células incubaram por 3, 24 e 48 horas. Após cada período de incubação o meio onde se encontravam foi retirado e guardado. Às células no poço foi adicionado 300 µL de TrypLE™ Express (Gibco®, Nova Iorque, EUA), incubando cerca de 5 minutos. Após destacarem foram transferidas para um tubo de centrifuga. A 300 µL do meio onde se encontravam as células e das células transferidas para o tubo de centrifuga foram adicionados 100 µL do azul de Trypan. A concentração celular (células/mL), tanto de células viáveis como de não viáveis, foi obtida multiplicando o número de células contadas pelo volume do hemocitómetro (10⁴ mL⁻¹) e pelo fator de diluição (400/300) a dividir pelo número de quadrantes onde foram contadas células, como está representado na equação 2.4.

Equação 2. Erro! Marcador não definido. *Nº Células/mL*

$$= \frac{N^{\circ} \text{ Total de Células Contadas} \times 10^4}{N^{\circ} \text{ Quadrantes}} \times \frac{400}{300}$$

Para facilitar a análise dos resultados, a concentração celular de cada condição foi normalizada e apresentada em percentagem.

2.5. Potencial Apoptótico

2.5.1. Marcação com Hoechst 33258 e Iodeto de Propídeo

Como análise inicial, do mecanismo envolvido no potencial citotóxico do composto Ps35 na linha tumoral A2780, realizou-se um ensaio de microscopia de fluorescência onde se utilizou os corantes fluorescentes Hoechst 33255 (*Phenol,4-[5-(4-methyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-trihydrochloride*23491-45-4) e Iodeto de Propídeo (IP) (Sigma, St. Louis Missouri, EUA). A utilização do Hoechst 33255 (excitação a 352 nm e emissão máxima de fluorescência a 461 nm) e IP (excitação a 535 nm e emissão máxima de fluorescência a 617 nm) permite a distinção entre células em apoptose e células em necrose.

Antes de cultivar as células, as lamelas (VWR, Europa) foram mergulhadas em etanol a 70 % (v/v) e foram deixadas a secar numa placa de 24 poços (SPL Life Sciences, Coreia), sendo de seguida lavadas com PBS 1x. Após este passo, as células A2780 foram semeadas na placa de 24 poços, $7,5 \times 10^4$ células/mL e incubadas nas condições descritas anteriormente, durante 24 horas, com o intuito de aderirem à lamela que se encontrava no fundo de cada poço utilizado. Após esse período o meio de cultura onde se encontravam foi substituído por meio completo contendo o IC₅₀ do composto nesta linha celular ou contendo DMSO a 0,1 % (v/v) (controlo realizado em todos os ensaios). Após 48 horas o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS 1x duas vezes e foram incubadas com uma solução contendo Hoechst 33258 (0,0075 mg/mL) e IP (0,25 µg/mL) em PBS 1x, durante 20 minutos a 37 °C. De seguida a solução foi removido e as células lavadas três vezes com PBS 1x, para então serem fixadas com paraformaldeído a 4 % (v/v) em PBS 1x, ficando à Tamb durante 20 minutos. Após lavagem com PBS 1x, três vezes, a lamela com as células é aplicada em cima de uma lâmina com uma gota de glicerol.

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas com uma extensão AXIO (Carl Zeiss, Oberkochen Alemanha), sendo tiradas imagens de 5 campos aleatórios com pelo menos 100 células contadas por amostra. As fotografias foram adquiridas e analisadas no *software* ZEN Blue edition (Carl Zeiss, Oberkochen Alemanha). Os valores médios apresentados foram expressos como a percentagem de núcleos apoptóticos.

2.5.2. Marcação com AnexinaV-FITC e IP

A dupla marcação com Anexina V-FITC e IP é um ensaio específico e rápido para quantificar células em apoptose e/ou necrose por citometria de fluxo. Com a utilização de Anexina V-FITC (excitação a 494 nm e emissão máxima de fluorescência a 518 nm) e IP, é possível identificar células em apoptose inicial, células em apoptose tardia e células em necrose (Brumatti, Sheridan, and Martin 2008).

Devido à dificuldade de marcação da Anexina V-FITC na linha celular A2780, este ensaio foi realizado utilizando a linha celular HCT116.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços (SPL Life Sciences, Coreia), a uma concentração celular de $7,5 \times 10^4$ células/poço e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 24 horas. Após este período o meio foi substituído por meio completo contendo o IC₅₀ do composto para esta linha celular, 0,1% (v/v) de DMSO, ou DOX (0,4 μM) e as células foram incubadas durante 48 horas nas mesmas condições referidas anteriormente. Após este período, as células foram recolhidas por tripsinização e centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos à Tamb. O sedimento resultante foi ressuscitado em 1 mL de PBS 1x a 4 °C. Para a lavagem das células este passo foi repetido duas vezes. Após as centrifugações, o sedimento obtido foi ressuscitado em 100 μL de tampão de ligação da Anexina V 1x, 5 μL de Anexina V conjugada com FITC e 2 μL de IP (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*; Invitrogen, EUA), sendo as células incubadas 15 minutos na ausência de luz e à temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 400 μL de tampão de ligação da Anexina V 1x e 500 μL de PBS 1x a 4 °C. A quantificação das amostras foi realizada por citometria de fluxo no citómetro de fluxo Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, EUA) pela aquisição de 10000 eventos por amostra e a análise dos resultados foi realizada através do Attune® Cytometric software (Life Technologies).

2.5.3. Alteração do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é um importante parâmetro da função mitocondrial e um indicador da saúde celular. Para medir a alteração do $\Delta\Psi_m$ foi utilizada a sonda fluorescente catiónica lipofílica 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3 tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) (Abnova Corporation, Walnut, CA, EUA).

Antes de cultivar as células, as lamelas (VWR, Europa) foram mergulhadas em etanol a 70 % (v/v) e foram deixadas a secar numa placa de 24 poços (SPL Life Sciences, Coreia), sendo de seguida lavadas com PBS 1x. A linha celular A2780 foi cultivada a uma concentração celular de $7,5 \times 10^4$ células/mL, incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 24 horas, com o intuito de aderirem à lamela que se encontrava no fundo de cada poço utilizado. Após este período o meio foi substituído pelo IC₅₀ do composto para esta linha celular ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo. As células foram incubadas durante 48 horas nas condições referidas anteriormente. Para a avaliação da intensidade de fluorescência, as células foram marcadas com uma solução de coloração JC-1 durante 20 minutos a 37 °C ao abrigo da luz. Após incubação, a lamela com as células é aplicada em cima de uma lâmina.

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas com uma extensão AXIO (Carl Zeiss, Oberkochen Alemanha), sendo tiradas imagens de 5 campos aleatórios com pelo menos 100 células contadas por amostra. As fotografias foram adquiridas pelo software ZEN Blue edition (Carl Zeiss, Oberkochen Alemanha) e analisadas no software ImageJ (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EUA).

2.5.4. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A oxidação da diclorofluoresceína diacetato (H2DCF-DA) (*Molecular Probes: Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents*, Invitrogen, Nova Iorque, EUA) intracelular tem sido utilizada de forma a detetar a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células. Quando o H2DCF-DA é oxidado por peróxidos origina uma forma oxidada fluorescente chamada 2,7-diclorofluorescina (DCF), que é detetada por microscopia de fluorescência (Marchi et al. 2011)

Antes de cultivar as células, as lamelas (VWR, Europa) foram mergulhadas em etanol a 70 % (v/v) e foram deixadas a secar numa placa de 24 poços (SPL Life Sciences, Coreia), sendo de seguida lavadas com PBS 1x. As células A2780 foram cultivadas a uma densidade celular de $7,5 \times 10^4$ células/mL, e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 24 horas, com o intuito de aderirem à lamela que se encontrava no fundo de cada poço utilizado. Após este período o meio foi substituído pelo IC₅₀ do composto para esta linha celular, 0,1 % (v/v) de DMSO, ou 25 µM de peróxido de hidrogénio (controlo positivo) em meio completo. Após a incubação de 48 horas, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x e incubadas com 10 µM de H2DCF-DA em PBS 1x pré-aquecido, durante 20 minutos a 37 °C, na ausência de luz. Após este período, realizou-se três lavagens com PBS 1x de forma a eliminar o H2DCF-DA não ligado. De seguida, fixou-se as células com 4 % (v/v) de paraformaldeído e incubou-se durante 20 minutos à Tamb. Após lavagem com PBS 1x, três vezes, a lamela com as células é aplicada em cima de uma lâmina com uma gota de glicerol.

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas com uma extensão AXIO (Carl Zeiss, Oberkochen Alemanha), sendo tiradas imagens de 5 campos aleatórios com pelo menos 100 células contadas por amostra. As fotografias foram adquiridas no *software* ZEN Blue edition (Carl Zeiss, Oberkochen Alemanha) e analisadas no *software* ImageJ (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EUA).

2.5.5. Proteínas anti- e pro-apoptóticas por *Western blot*

2.5.5.1. Preparação das amostras

Para a extração de proteínas, as células A2780 foram cultivadas em frascos de cultura 75 cm² a uma densidade celular de 4×10^6 células/mL, e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 24 horas. Após este período o meio foi substituído pelo IC₅₀ do composto para esta linha celular ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo. Após 48 horas de incubação, as amostras com as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e recolhidas com um raspador em 2 mL de PBS 1x para um tubo de centrífuga em gelo. As amostras foram centrifugadas a 700 x g, por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Para que todo o PBS seja removido, realizou-se um *spin* final. De seguida, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de uma solução de lise celular contendo o tampão NaCl-Tris-EDTA (NaCl 150mM; 50 mM Tris, pH=8; EDTA 5 mM), inibidores de fosfatase 1x (PhosStop, Roche), inibidores de proteases 1x (complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche, Suíça), 0,1 % (p/v) de ditioneitol (DTT; AMRESCO, EUA), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Sigma, St. Louis, EUA) e 2 % (p/v) de NP-40 (Thermo Scientific, MA, EUA). As amostras

foram armazenadas a -80 °C, até processamento posterior. Após o descongelamento, todas as amostras foram submetidas a pulsos contínuos no banho de ultrassons em gelo, durante 2 minutos 30 segundos e mantida em gelo durante 1 minuto de forma a evitar o aquecimento da amostra. Após 6 ciclos, os lisados celulares foram centrifugados a 10000 x g por 5 minutos e os sobrenadantes foram recuperados.

Para a quantificação da proteína, utilizou-se o *kit Pierce Protein Assay* (Thermo Scientific, MA, EUA). Numa primeira fase, foi estabelecida uma curva de calibração com várias soluções padrão de BSA de 0 a 1000 µg/mL (Thermo Scientific, MA, EUA) e os extratos de proteína foram diluídos numa proporção de 1:10 em água ultrapura (18.2 MΩ.cm-1 a 25 °C). Sequencialmente adicionou-se 150 µL do reagente de Pierce e incubou-se durante 5 minutos à Tamb, na ausência de luz. A absorvância das amostras foi medida através do leitor de microplacas *Tecan Infinite F200* (Tecan, Männedorf, Suíça) a 660 nm. Após a quantificação, 10 µg foram transferidos para outro microtubo juntamente com o tampão de dodecilsulfato de Sódio (SDS) a 4x e 3 % (p/v) de DTT. As amostras foram fervidas a 70 °C durante 5 minutos e colocadas em gelo após esse período. Antes de colocar as amostras no gel foi adicionado 1 µL de 30 % (p/v) DTT em todas as amostras.

2.5.5.2. SDS-PAGE e transferência para membrana de nitrocelulose

Preparou-se um gel de SDS-PAGE e correu-se as amostras a 120 V e 50 mA durante 1 hora. Após a conclusão do SDS-PAGE, realizou-se a transferência eletrônica para uma membrana de nitrocelulose. Preparou-se uma sanduiche de transferência, em que o gel estava em contacto com a membrana, entre um par de folhas de papel de filtro e esponjas. Após a montagem do dispositivo, o reservatório foi preenchido com tampão de transferência 4 °C (25 mM Tris, 192 mM de Glicina, 20 % (v/v) metanol, pH = 8,3) até que a sanduiche estivesse completamente coberta. A transferência ocorreu durante a noite a 4° C a 40 V.

2.5.5.3. Incubação com anticorpo primário e secundário

A membrana possui uma alta afinidade por proteínas, por isso, de forma a bloquear ligações não específicas à proteína, foi necessário incubar a membrana com um agente de bloqueio. Assim, a membrana foi bloqueada com uma solução de bloqueio com 5 % de leite em pó desnatado em tampão TBST 1x (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,1% (v/v) de Tween 20, pH= 7,5) e incubada durante 1 hora, à Tamb em constante agitação. De seguida, cada membrana de nitrocelulose foi exposta a diferentes anticorpos primários em 5 % de leite não gordo em TBST. Nomeadamente, anti-Bax (1:5000; Abcam, Reino Unido), anti Bcl-2 (1:1000; Sigma, St. Louis, EUA) e foi deixado a incubar durante 1 hora à Tamb, com constante agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBST 1x durante 5 minutos, com constante agitação. O mesmo procedimento foi aplicado à membrana com a incubação do anticorpo secundário (1:3000, *Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase (HPR)-linked Antibody* ou 1:2000, *Anti-rabbit IgG, HPR-linked Antibody*; Cell Signalling Technology, EUA). Todas as membranas foram incubadas com o tampão *stripping* (0,1 M de glicina, 20 mM de acetato de magnésio e 50 mM de cloreto de potássio) e, em seguida, foram

incubadas com anti β -actina (1:5000; Sigma, St. Louis, EUA) como um controle para a normalização de resultados.

2.5.5.4. Exposição do filme

De forma a detetar as bandas das proteínas na membrana, foi preparado o substrato de *WesternBright ECL* (Advansta, EUA). O ECL é um substrato quimioluminescente para a detecção da atividade da peroxidase de rabano a partir de anticorpos secundários. A membrana foi totalmente coberta pelo substrato e incubada durante 5 minutos. Sequencialmente, o filme foi exposto à membrana, num quarto escuro. A quantificação das bandas de proteínas foi determinada usando o *software ImageJ*.

2.6. Autofagia

Para detecção de autofagia na linha celular A2780 foi utilizado o *CYTO-ID® Autophagy Detection Kit* (Enzo Life Sciences, Reino Unido).

Antes de cultivar as células, as lamelas (VWR, Europa) foram mergulhadas em etanol a 70 % (v/v) e foram deixadas a secar na placa de 24 poços (SPL Life Sciences, Coreia), sendo de seguida lavadas com PBS 1x. As células A2780 foram cultivadas a uma concentração celular de $7,5 \times 10^4$ células/mL, e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 24 horas, com o intuito de aderirem à lamela que se encontrava no fundo de cada poço utilizado. Após este período o meio foi substituído pelo IC₅₀ do composto para esta linha celular ou contendo DMSO a 0,1 % (v/v) ou ainda após 24 horas a dois poços foi adicionado 5 μ L de rapamicina a 50 mM, sempre em meio completo. Após 48 horas de incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas com tampão AB (este além de conter PBS 1x tem na sua constituição água e FBS) duas vezes, sendo adicionado uma solução com os corantes fluorescentes CYTO-ID (excitação a 463 nm e emissão máxima de fluorescência a 534 nm) e o corante Hoechst 33328, durante 30 minutos a 37 °C. Após incubação a solução foi removida e as células lavadas três vezes com tampão AB, para então serem fixadas com paraformaldeído a 4 % (v/v) em PBS 1x, ficando à Tamb durante 20 minutos. Após lavagem com o tampão AB, três vezes, a lamela com as células é aplicada em cima de uma lâmina usando uma gota de glicerol.

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas com uma extensão AXIO (Carl Zeiss, Oberkochen Alemanha), sendo tiradas imagens de 5 campos aleatórios com pelo menos 100 células contadas por amostra. As fotografias foram adquiridas e analisadas no *software* ZEN Blue edition (Carl Zeiss, Oberkochen Alemanha).

2.7. Progressão do Ciclo celular

O efeito do composto na progressão do ciclo celular foi quantificado por citometria de fluxo com base no conteúdo de DNA das células coradas com IP.

Para a análise as células A2780 foram cultivadas em placas de 6 poços (SPL Life Sciences, Coreia), a uma concentração celular de 1×10^5 células/mL e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. As células foram sincronizadas por um duplo bloqueio com timidina (Sigma, St. Louis, EUA), um bloqueador de fase S usado comumente para sincronizar as células no início da fase S (H. T. Ma and Poon 2011). Após 8 horas de cultivar as células, o primeiro bloqueio foi realizado com a adição de 2 mM de timidina no meio de cultura, incubando por 16 horas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. As células foram posteriormente mantidas em meio de cultura sem timidina por 8 horas, nas mesmas condições descritas anteriormente. De seguida adicionaram-se 2 mM de timidina (2º bloqueio), e as células foram incubadas por 16 horas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Após este período de incubação, removeu-se o meio com timidina e procedeu-se à exposição das células ao IC₅₀ do composto Ps35, ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo, com incubação a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 9, 12 e 24 horas. As células de um poço foram fixadas, de acordo com o protocolo seguinte, imediatamente após o fim do segundo bloqueio e utilizadas como controlo do método de sincronização. Após cada período de tempo as células foram tripsinizadas com *TrypLE™ Express* e centrifugadas a 650 x g por 5 minutos a 20 °C, com eliminação dos sobrenadantes. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1x a 4 °C e centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos e 4 °C. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 100 µL de PBS 1x a 4 °C, adicionando-se, posteriormente, gota a gota, a 1 mL de uma solução de etanol a 80 % (v/v) com agitação suave, para a fixação das células. As amostras foram de seguida armazenadas a 4 °C no mínimo durante 16 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e ressuspendido numa solução de 50 µg/mL de RNase A em PBS 1x e incubados durante 30 minutos a 37 °C. Após foi adicionado 25 µg/mL de IP e 650 µL de PBS 1x. A análise do conteúdo de DNA foi realizada no citómetro de fluxo *Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer* (Life Technologies, Carlsbad, EUA) pela aquisição de 10000 eventos por amostra e a análise dos resultados foi realizada através do *software FCS Express 6 Flow Cytometry*.

2.8. Localização

Como forma de avaliar a entrada do composto para dentro da célula recorreu-se à técnica de Espetrometria de emissão atómica com plasma indutivo (ICP-AES, do inglês: *inductively coupled plasma mass spectrometry*) através de um serviço contratado (Laboratório de análises, serviço de espectroscopia de emissão atómica, Departamento de Química, FCT-UNL).

Para a preparação das amostras as células A2780 foram cultivadas em frascos de cultura 25 cm² a uma densidade celular de 5×10^5 células/mL, e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 24 horas. Após este período o meio foi substituído por uma solução de Ps35 a 20 µM ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio completo indo incubar por 3 horas. De seguida o meio onde se encontravam foi retirado e guardado em Tubos Facon de 15 mL. Às células no frasco de cultura foi adicionado 2 mL de *TrypLE™ Express* (Gibco®, Nova Iorque, EUA), incubando cerca de 5 minutos à Tamb. Após destacarem as células foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL sendo

centrifugadas durante 5 minutos a 700 x g e 20 °C. É descartado o sobrenadante e o sedimento de células é guardado. Um dia antes de enviar as amostras para análise, é adicionada água régia preparada de fresco.

2.9. Interação do composto com o DNA *in vitro*

Os ensaios de interação do composto com o DNA *in vitro* foram realizados pelo aluno Paulo Faria sob minha supervisão, sendo aqui apresentados os aspetos cruciais do protocolo realizado.

2.9.1. Clivagem de DNA plasmídico

Dois ensaios independentes foram efetuados com DNA de pUC18 (100 ng) incubado na presença de concentrações crescentes de Ps35 (50, 100 e 200 µM) ou na sua ausência (apenas pUC18 ou 1 % DMSO (v/v), ambos controlos), em tampão fosfato 0,02 M, 100 mM NaCl (pH 7.0). Cada ensaio foi programado para um volume final de 20 µL. Todas as amostras foram incubadas durante 24 horas, a 37 °C. Uma das amostras incubadas continha apenas DNA de pUC18 (100 ng), e entre a 23^a e 24^a horas de incubação, foi adicionada a enzima *HindIII* para linearizar o plasmídeo. Terminado o tempo de incubação, 5 µL de *loading buffer* 5x (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 50 % glicerol, 0,1 % azul de bromofenol) (Bioline, Londres, Reino Unido) foram adicionados a cada amostra. Estas foram posteriormente aplicadas num gel de agarose 0,8% (p/v), e as eletroforeses realizadas em tampão TAE 1x, a uma voltagem constante de 70 V. Os géis obtidos após cada eletroforese foram analisados e fotografados num sistema GelDoc XR+, usando o *software Quantity One* para aquisição de imagem.

2.9.2. *Melting* de Alta Resolução (HRM)

A interação do composto e os amplicões *MYBPC3_ex7* foi estudada recorrendo à técnica de HRM. Previamente ao início dos ensaios de HRM, o DNA presente em cada amostra foi quantificado por espectroscopia de UV-Visível no NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer. Os ensaios consistiram em duas etapas: incubação e *melting*. Na primeira etapa, todas as amostras utilizadas foram incubadas durante 1 hora a 37 °C e, após o fim do tempo de incubação, foi adicionada a cada amostra a sonda fluorescente EvaGreen® 5x (4 µL nos ensaios 1 e 2, 6 µL no ensaio 3) (Biotium, Fremont, CA, EUA). Na etapa de *melting*, as amostras foram brevemente incubadas no aparelho (3 minutos a 37° C), para permitir a ligação da sonda fluorescente ao DNA, seguindo-se a aplicação do aquecimento programado. Relativamente aos reagentes utilizados, as soluções preparadas para cada ensaio encontram-se descritas no anexo B, tabela 6.1 e, em relação aos ensaios de *melting*, as condições utilizadas no Rotor-Gene 6000 (Corbett, Mortlake, Australia) foram compostas por uma rampa de temperatura de 37 °C a 95 °C, aguardando 4 segundos entre medições e com aumento de 1 °C/medição.

2.9.3. Espectroscopia UV-Visível

A interação entre o Ps35 e os amplicões do gene *c-Myc* foi estudada através de espectroscopia de UV-Visível. Dois ensaios foram efetuados: no primeiro, os amplicões usados foram cedidos pelo laboratório, sendo a concentração da solução fornecida cerca de 250 ng/μL; no segundo ensaio, os amplicões utilizados foram aqueles obtidos nas reações de PCR. Neste último caso, os amplicões das duas reações de PCR foram misturados num tubo de centrífuga e o DNA quantificado por espectroscopia de UV-Visível no NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer. Após a determinação da concentração dos amplicões, foi elaborada a mistura reacional. Previamente aos ensaios, as amostras foram incubadas a 37 °C durante 3 horas. Estes foram realizados num Thermo Scientific™ Evolution™ 300 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), equipado com um controlador de temperatura e suporte de *cuvettes* termostatizado Peltier. As condições de desnaturação foram compostas por uma rampa de temperatura (20 a 90 °C no ensaio 1, e 40 a 100 °C no ensaio 2), uma taxa de aquecimento constante de 5 °C/minuto e a cada 12 segundos foi efetuada uma nova leitura.

2.10. Interação do composto com a albumina de soro bovino (BSA) e humana (HSA) *in vitro*

Os ensaios de interação do composto com a albumina *in vitro* foram realizados pela aluna Sara Murilhas, sob minha supervisão, sendo aqui apresentados os aspetos cruciais do protocolo realizado.

2.10.1. Espectroscopia

2.10.1.1. Absorção UV-Visível

Na espectroscopia de absorção UV-Visível a concentração de BSA foi constante (15 μM) e a concentração de Ps35 variada entre 7,5 e 75 μM, correspondendo a 2:1, 1:1, 1:2 e 1:5. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 24 horas antes da realização das leituras. Os espectros de absorção UV-Visível foram obtidos a Tamb utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240 (Shimadzu, Quioto, Japão) lendo-se os comprimentos de onda entre os 200 e 500 nm, tendo sido utilizada uma cuvette de quartzo Suprasil (Hellma). O valor de absorvância do tampão e cada percentagem de DMSO foi descontado a cada amostra respetiva. A referência de BSA em cada espectro de interação foi também a incubada com as respetivas concentrações de DMSO, correspondente à percentagem presente nas diferentes concentrações de composto.

2.10.1.2. Fluorescência

Na espectroscopia de fluorescência a concentração de HSA foi constante (15 μM) e a concentração de Ps35 variada entre 15 e 150 μM, correspondendo a 1:1, 1:4 e 1:10. As amostras foram igualmente incubadas a 37 °C durante 24 horas. Os espectros de fluorescência foram obtidos a Tamb com um fluorímetro CARY Eclipse (VARIAN, Califórnia, EUA), recorrendo a excitação a 295 nm e varrimento entre os 300 e 650 nm. O *setup* foi na velocidade lenta (120 nm/minutos) utilizando *slits* de 5 nm.

2.10.2. Docking molecular

A estrutura de HSA foi obtida através do PDB (do inglês: *Protein data bank*), acoplada com um dos vários marcadores específicos dos dois principais *binding sites* da albumina. Os marcadores de referência utilizados foram a warfarina para o *site* 1 (Código PDB 2BXD), e o diazepam para o segundo *site* (Código PDB 1O9X). Todas as moléculas de água foram removidas da estrutura, sendo de seguida adicionados os hidrogénios e, por fim, tendo sido removido o ligando que servia de marcador. Foi realizado um *dock* do marcador à proteína, centrando a *grid* no ligando, de forma a garantir que a estrutura se encontrava otimizada. Após esta simulação as coordenadas de AutoGrid obtidas foram de X= 4.214; Y= -9.46; Z= 7.94 para o *site* 1 e X= 54.235; Y= 35.601; Z= 74.441 para o *site* 2.

Todas as simulações foram corridas utilizando o programa AutoDock Tools-1.5.6., mantendo a HSA rígida (específica para o *binding site* em cada simulação) e o ligando flexível, recorrendo a um algoritmo genético Lamarkiano, seguindo os parâmetros padrão (anexo C, figura 6.5). O *dock* do composto requisitou a edição do ficheiro “PDBQT” de texto de modo a introduzir na prata a carga (+1). Foi também necessário reencaminhar através do editor de texto esse mesmo ficheiro e os ficheiros “.GPF” e “.DPF” (respetivamente para os ficheiros descritivos da AutoGrid e de AutoDock) para novos parâmetros que abranjam a prata, uma vez que o programa não os possui de origem. Três diferentes *grids* (36x36x36; 40x40x40 e 50x50x50) com um espaçamento padrão de 0.375 Å foram testadas. Para cada uma destas, a estrutura do composto foi otimizada pela rotação de todas as ligações simples da molécula no total de 5 locais de torção, tendo sido selecionada como a mais favorável a conformação que possuía menor energia de ligação.

2.11. Proteómica

2.11.1. Preparação da amostra, precipitação e purificação

As células A2780 foram cultivadas em frascos de cultura 75 cm² a uma densidade celular de 4×10^6 células/mL, e incubadas nas mesmas condições descritas na secção 2.5.5.1. O lisado celular foi centrifugado a 10000 x g, durante 5 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram recuperados. A precipitação e a purificação dos extratos de proteínas total foram realizadas com o *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Gorg 2004), à exceção do passo de adição do *wash buffer* e do *wash additive*, em que foi efetuada uma incubação *overnight* a -20 °C. Posteriormente, também foi realizado uma lavagem adicional, onde 25 µL de água ultrapura (18.2 MΩ.cm-1 a 25°C) foi adicionado de forma a dispersar o sedimento. O *wash buffer* e o *wash additive* foram adicionados nas mesmas proporções, de acordo com o protocolo do fabricante. Após a centrifugação, os sedimentos foram ressuspensos em 120 µL de uma solução de reidratação contendo 7 M de Ureia (BDH Prolabo, VWR International), 2 M Tioreia (Merck, Frankfurt, Alemanha), 2 % (p/v) de CHAPS (GE Healthcare, Reino Unido), inibidores de fosfatases 1x, inibidores de proteases 1x, vestígios de azul de bromofenol (Merck, Frankfurt, Alemanha), 0,1 % (p/v) de DTT e 1 mM PMSF. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente

durante 48 horas. Por fim, centrifugaram-se as amostras a 12000 x g durante 10 minutos, recuperando os sobrenadantes. O estrato de proteínas total foi quantificado imediatamente antes da focagem isoelétrica utilizando o *Pierce Protein Assay Kit*, descrito na secção 2.5.5.1.

2.11.2. Eletroforese bidimensional (2-DE): Focagem isoelétrica e SDS-PAGE

A eletroforese bidimensional permite a separação das proteínas através de duas etapas: a focagem isoelétrica e a eletroforese em géis de SDS-PAGE. A focagem isoelétrica, ou 1ª dimensão, permite a separação das proteínas consoante o seu ponto isoelétrico. A 2ª dimensão, realizada pela utilização de géis SDS-PAGE, permite a separação das proteínas de acordo com a sua massa molecular.

Para a realização da focagem isoelétrica (IEF) utilizaram-se 100 µg do extrato proteico total. O volume correspondente aos 100 µg de extrato de proteína total foi distribuído ao longo do suporte de tiras de 7 cm *IPG strip holder* (GE Healthcare, Reino Unido), ressuspendido em 125 µL de uma solução de reidratação suplementada com 0,5 % de IPG (GE Healthcare, Reino Unido) e 0,5 % de *destreak* (GE Healthcare, Reino Unido). Após a distribuição colocou-se por cima uma tira *Immobiline Dry strip* pH 3-10 NL de 7 cm (GE Healthcare, Reino Unido), de modo que o gel ficasse em contacto com a amostra e não se formassem bolhas entre o gel e a amostra. Selou-se o suporte com 750 µL de *Drystrip Cover Fluid* (GE Healthcare, Reino Unido) e colocou-se a respetiva tampa. Os suportes foram posteriormente dispostos no sistema de isofocagem ETTAN IPGphor 3 IEF (GE Healthcare, Reino Unido), e a focagem isoelétrica foi realizada através do programa indicado na tabela 2.3 a uma temperatura constante de 20 °C.

Tabela 2.3 - Programa utilizado na focagem isoelétrica.

Passo	Duração	Voltagem (V)
1	14 horas	20
2	30 minutos	100
3	30 minutos	500
4	30 minutos	1000
5	15 minutos	5000

Após a IEF, as tiras foram removidas dos suportes e equilibradas, durante 15 minutos com agitação horizontal, em 5 mL de solução de equilíbrio (70 mM de Tris-HCl pH 8,8 (Merck), 6 M de ureia (Scharlau), glicerol 30 % (v/v) (Panreac) e 2 % (p/v) de dodecil-sulfato de sódio (GE Healthcare, Reino Unido), suplementada com 1 % (p/v) de DTT. De seguida, as tiras foram transferidas para uma nova solução de equilíbrio suplementada com 2,5 % (p/v) de iodocetamida (GE Healthcare, Reino Unido) onde permaneceram durante 15 minutos com agitação horizontal.

Para a segunda dimensão da eletroforese bidimensional, prepararam-se géis de poli(acrilamida a 12,5 % (v/v) contendo: 4,8 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30 % (Merck), 3 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 4,2 mL de água ultrapura (18.2 MΩ.cm⁻¹ a 25 °C), 90 µL de persulfato de amónia a 10% (v/v)

(APS, do inglês: Ammonium Persulfate; Biorad, Califórnia, EUA) e 12 µL tetrametiletilenodiamina (TEMED, do inglês *tetramethylethylenediamine*; Sigma, St. Louis, EUA). Após a polimerização do gel, as tiras foram colocadas por cima dos géis de poliacrilamida, juntamente com o marcador de pesos moleculares *NZY Colour Protein Marker II* (NZYTech, Lisboa, Portugal), selando-se de seguida com uma solução de agarose 0,5 % (p/v) (Lonza, Basel, Suíça) em tampão de eletroforese (3,79 g/L de Tris-base, 18 g/L de glicina (Panreac), 1,25 g/L SDS e vestígios de azul de bromofenol). O sistema de SDS-PAGE Mini-PROTEAN®3 System (BioRad) foi utilizado para na corrida da eletroforese, durante 30 min a 30 V e seguidamente a 120 V até o azul de bromofenol ser eliminado para o tampão de eletroforese.

2.11.3. Revelação dos géis

Os géis resultantes foram corados a quente numa solução contendo três pastilhas de PhasTGel™ Blue R (Coomassie R350) (GE Healthcare) dissolvidas em 1 L de ácido acético a 10 % (v/v) (Panreac) em água destilada, sendo aquecidos em intervalos de 30 min por três vezes. Para a revelação dos géis realizaram-se várias lavagens com água ultrapura (18.2 MΩ.cm⁻¹ a 25 °C), aquecida nas mesmas condições referidas anteriormente. Os géis foram digitalizados através do scanner PIXMA M250 (Canon) e analisados no programa Melanie 7.0 (GeneBio, Genebra, Suíça). A análise foi realizada por deteção automática dos spots, identificação dos spots de proteínas, correspondência dos spots entre os diferentes géis e determinação da intensidade/expressão de cada spot. A variação dos níveis de expressão de cada proteína foi calculada a partir da razão entre a intensidade de cada um dos spots das amostras pela intensidade de cada um dos spots dos controlos. Os níveis de expressão <0,7 (sub-expressão da proteína) e >1,5 (proteína sobre-expressão) foram considerados significativos.

2.12. Estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± SEM de pelo menos dois ensaios biológicos independentes com triplicados técnicos cada um. O programa GraphPadPrism 6 software foi utilizado na análise dos resultados através *One* ou *Two-way ANOVA* ou *Student's t-test* de forma a comparar o grupo de controlo com os grupos tratados para a significância estatística. Resultados com um $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composto em Estudo

Neste trabalho prático foi estudada a ação antiproliferativa do composto tris(pirazolil)metanosulfonato de prata I, $\text{Ag}_2(\text{tpms})_2$, nomeado de Ps35 no decorrer deste trabalho (figura 2.1).

A solubilidade dos compostos em soluções aquosas tem um papel fundamental no sucesso dos ensaios biológicos *in vitro*, pois afeta a sua absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade. Assim, no caso do composto em estudo, que apresenta uma baixa solubilidade em água, foi necessário usar um solvente orgânico adequado aos ensaios biológicos.

O DMSO é uma molécula orgânica polar aprótica muito utilizada como solvente para a solubilização de fármacos hidrofóbicos devido à sua natureza anfipática, a grande capacidade de solvatação e relativamente altos ponto de ebulição e temperatura de congelamento (Balakin, Savchuk, and Tetko 2006; Galvao et al. 2014). No entanto são necessárias precauções ao se trabalhar com este solvente pois a partir de uma determinada concentração ($>10\%$ (v/v)) já foram descritos casos do DMSO induzir apoptose através da formação de poros na membrana plasmática (Galvao et al. 2014). Assim em todos os ensaios realizados o composto Ps35 foi dissolvido em DMSO a 100% (v/v) colocando-se a solução num banho de ultrassons de forma a se atingir o máximo de solubilização do composto. No entanto foi utilizada uma concentração máxima de 0,1% (v/v) de DMSO nos ensaios com células, sendo que a esta concentração não existe nenhum efeito por parte do solvente nos modelos celulares utilizados (Oscar A. Lenis-Rojas et al. 2017; Sutradhar et al. 2017).

3.1.1. Solubilidade do composto

Como forma de analisar a solubilidade do composto após este ser dissolvido e armazenado começou-se por identificar a melhor concentração para realizar estes estudos. Assim a partir da solução *stock* a 5000 μM feita no próprio dia em 100 % (v/v) DMSO (referida como condição a fresco) foram realizadas diluições em DMSO para as concentrações de 25 μM e 50 μM , sendo obtido os espectros de absorção (figura 3.1). Os varrimentos foram realizados de 230 a 800 nm mas a figura 3.1 apresenta apenas os comprimentos de onda entre 250 a 350 nm, zona de maior interesse pois compreende o pico de máxima absorvância do composto.

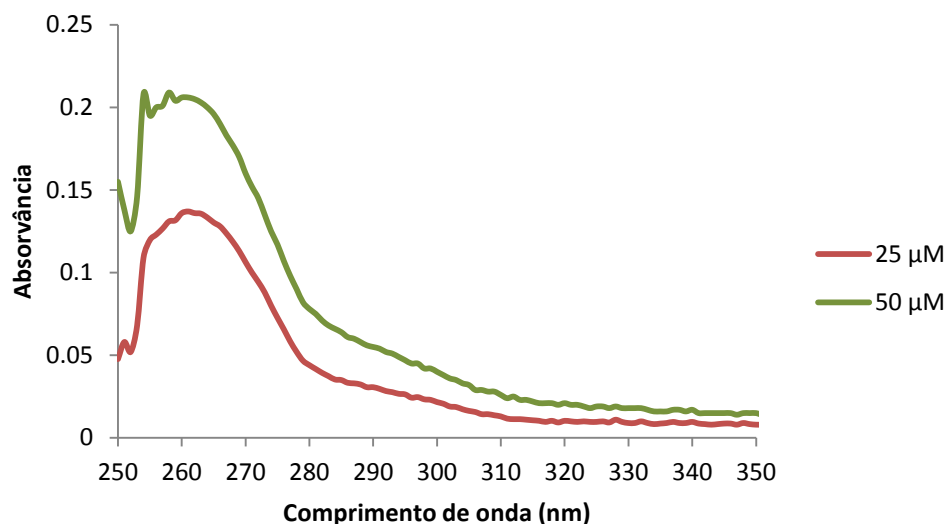


Figura 3.1 - Espectros de absorção de soluções a fresco do composto Ps35 nas concentrações de 25 μM (vermelho) e 50 μM (verde) em 100% (v/v) DMSO. Os resultados apresentados são de dois ensaios independentes.

O composto Ps35 apresenta uma absorvância máxima na zona dos 260 nm, estando bem patente este pico máximo de absorvância nas concentrações de 50 μM e 25 μM onde foi registada uma absorvância de 0,2 e 0,14, respetivamente (figura 3.1). Assim visto que a solução a 50 μM apresenta um pico bem visível e relativamente intenso, o que facilita a observação de possíveis alterações no espectro, foi esta a concentração escolhida para se analisar a estabilidade do composto.

Após ter determinado a concentração a utilizar (50 μM), foi realizado o ensaio para analisar a estabilidade¹ do composto após ser armazenado por 24h à T_{amb} ou a 4 $^{\circ}\text{C}$ nessa mesma concentração. Os resultados estão presentes na figura 3.2.

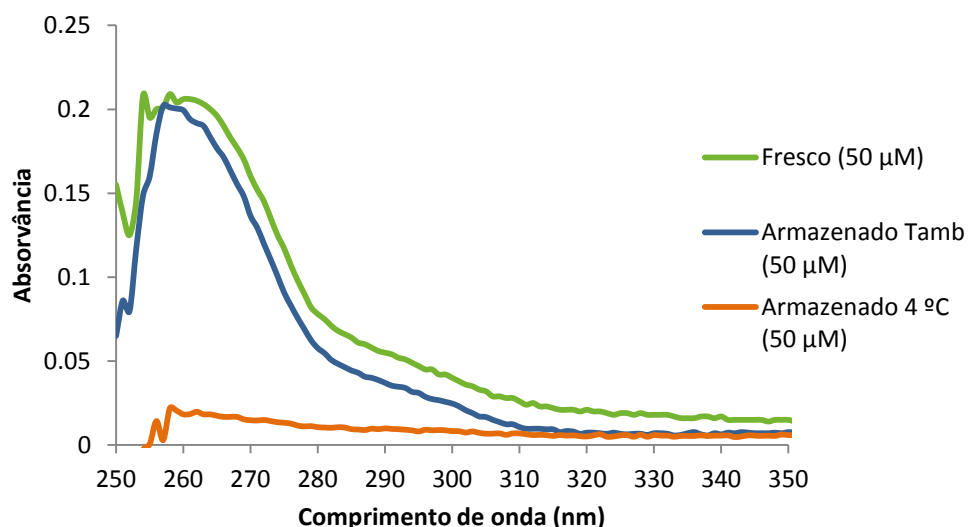


Figura 3.2 - Espectros de absorção de soluções a 50 μM do composto Ps35 nas condições: a fresco (verde), armazenada à T_{amb} por 24 horas (azul) e armazenada a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (laranja) em 100% (v/v) DMSO. Os resultados apresentados são de dois ensaios independentes.

¹ No contexto desta tese o termo “estabilidade” é entendida como manutenção do composto em solução. Assim a diminuição dessa “estabilidade” é interpretada maioritariamente como saída do composto de solução, não sendo de descurar que essa saída de solução se deva a instabilidade do mesmo.

Ao se analisar os espectros, é perceptível que a melhor forma de armazenamento durante 24 horas é à Tamb pois o pico máximo de absorvância situa-se praticamente ao mesmo comprimento de onda (260 nm) do composto a fresco, e a absorvância obtida também foi praticamente a mesma (0,2). Quando armazenado a 4 °C existe clara alteração no espectro do composto (absorvância praticamente zero) (figura 3.2). Esta alteração poderá ser devida ao facto de o composto “ter saído de solução” tornando-se insolúvel neste solvente a baixas temperaturas.

No entanto após algumas horas da solubilização do composto e em todas as soluções foi observado um precipitado preto (possivelmente óxido de prata (Ag_2O), todavia não foi confirmado quimicamente) no fundo do tubo de centrifuga sendo que, quanto maior a concentração da solução maior a quantidade de precipitado. Esta observação, juntamente com os dados espectrais do composto armazenado a 4 °C, permitem concluir que o composto deve ser preparado sempre de fresco sem qualquer armazenamento que possa comprometer a sua estabilidade.

3.2. Ensaio de citotoxicidade

Como forma de avaliar o potencial citotóxico *in vitro* do composto Ps35 foi realizado o ensaio do MTS. Este ensaio tem por base o poder redutor das células, onde células viáveis vão reduzir o MTS devido à ação de desidrogenases mitocondriais formando o formazano. Assim o que se mede diretamente é a atividade metabólica das células (proporcional à quantidade de formazano produzido) que é depois inversamente correlacionada com a capacidade antiproliferativa do composto (Riss et al. 2016).

A atividade antiproliferativa do Ps35 foi analisada em duas linhas tumorais, A2780 e HCT116, numa gama inicial de concentrações (0,25-50 μM) (anexo A, figura 6.1). Após 48 horas, o composto apresentou uma citotoxicidade superior na linha A2780 (na menor concentração testada, 0,25 μM , a viabilidade celular foi inferior a 20%). Após ajuste de concentrações a gama testada para a linha A2780 foi de 0,005 a 5 μM (figura 3.3 (A)) e para a linha HCT116 foi de 2,5 a 10 μM (figura 3.3 (B)), tendo-se obtido uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração de composto. Com esta diferença de concentrações analisadas, rapidamente, se percebe o potencial antiproliferativo do composto, em particular na linha A2780, onde uma menor concentração de composto reduz a viabilidade celular para níveis equivalentes, comparativamente à linha HCT116.

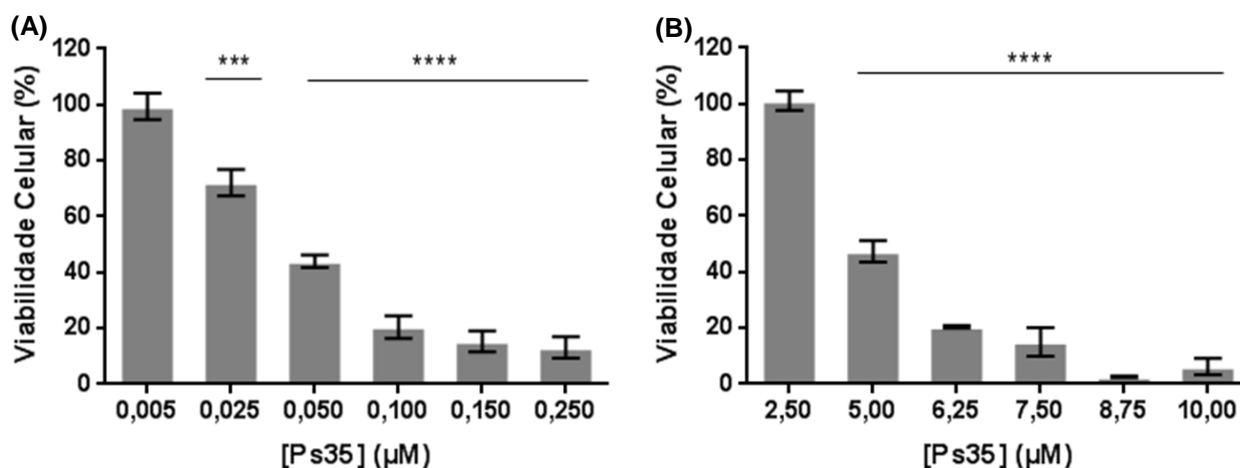


Figura 3.3 - Viabilidade celular da linha tumoral A2780 **(A)** e HCT116 **(B)** após 48 horas de exposição ao composto Ps35. Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao veículo de controle (0,1 % (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$) (comparando com o controle (0,1 % (v/v) DMSO) de cada linha celular).

A citotoxicidade do Ps35 foi igualmente analisada em células não tumorais – fibroblastos, como forma de se avaliar o potencial citotóxico do composto em células saudáveis. Nesta linha celular foi testada a gama de concentrações de 2,5 a 10 μM (as mesmas concentrações que foram analisadas na linha HCT116) (figura 3.4). Nos fibroblastos foi igualmente observada uma diminuição de viabilidade com o aumento da concentração de composto (idêntica à observada com a linha HCT116). Assim nesta gama de concentrações o composto não apresentou qualquer seletividade entre a linha tumoral HCT116 e a linha saudável de fibroblastos. No entanto, a gama de concentrações testada na linha A2780, apesar de não ter nenhum efeito na linha HCT116 também não irá afetar os fibroblastos, o que torna possível a utilização do composto na linha derivada do carcinoma de ovário uma vez que a potencial janela terapêutica já é aceitável.

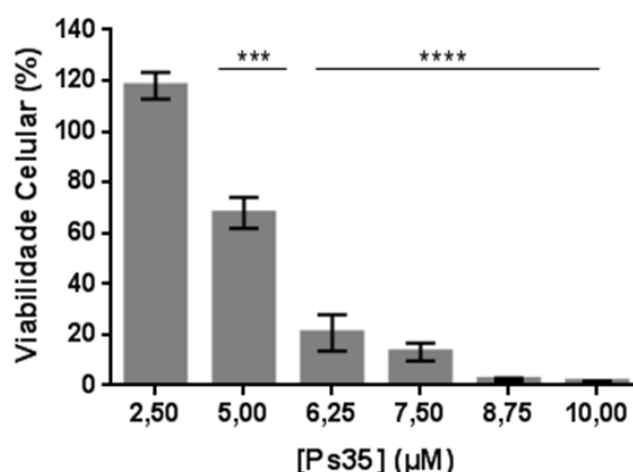


Figura 3.4 - Viabilidade celular na linha celular de fibroblastos após 48 horas de exposição ao composto Ps35. Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao veículo de controle (0,1 % (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$) (comparando com o controle (0,1 % (v/v) DMSO) de cada linha celular).

O IC₅₀ (concentração em que 50 % da proliferação celular é inibida) é um parâmetro que avalia o desempenho dos compostos. Neste trabalho foi utilizado o IC₅₀ relativo. Este é calculado como o ponto médio entre um patamar de viabilidade máxima e um patamar de viabilidade mínima de uma curva de concentração-resposta (Sebaugh 2011). Neste trabalho o ponto médio é interpretado como a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50 %.

Este composto apresenta um IC₅₀ extremamente baixo na linha A2780, 0,04 µM, enquanto para a linha HCT116 o valor já é mais elevado, 4,73 µM, e encontra-se perto do valor obtido para a cultura de fibroblastos, 5,18 µM (resultado que já era esperado) (tabela 3.1). Como forma adicional de avaliar o potencial citotóxico deste composto foi também calculado o índice de seletividade com base no valor do IC₅₀ das linhas tumorais em relação à linha saudável de fibroblastos. Assim quanto maior o valor do índice de seletividade mais seletivo vai ser o composto para a linha tumoral (Czerwińska et al. 2017). Com o resultado deste índice fica bem patente a seletividade do composto para com a linha A2780, sendo 140 vezes mais seletivo para esta linha tumoral do que para a linha não tumoral (fibroblastos) (tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Citotoxicidade do composto Ps35, representada com o IC₅₀ relativo nas linhas celulares A2780, HCT116 e fibroblastos. A atividade antiproliferativa foi avaliada após 48 horas de exposição. Índice de seletividade do composto Ps35 nas linhas tumorais estudadas. Os dados representados estão expressos como a média ± SEM de três ensaios biológicos.

Linha Celular	IC ₅₀ relativo (µM)	Índice de Seletividade
A2780	0,04 ± 0,01	140
HCT116	4,73 ± 0,16	1,09
Fibroblastos	5,18 ± 0,10	-

Para comparação do potencial terapêutico deste composto com fármacos já aprovados na prática clínica, foi utilizado a doxorrubicina (DOX) a uma concentração de 0,4 µM nas duas linhas tumorais, A2780 e HCT116. A DOX é um dos fármacos mais utilizado em quimioterapia nos dias atuais, sendo que o valor testado nestas duas linhas é próximo do seu IC₅₀ (com esta concentração foi obtido uma viabilidade de 44 % na linha A2780 e de 51 % na linha HCT116). O composto Ps35 é consideravelmente mais citotóxico para a linha A2780 onde, é necessária uma concentração 10 vezes menor para se obter o mesmo efeito que com DOX. Por outro lado, no que respeita às células HCT116 é precisamente o contrário, uma vez que para se obter o mesmo efeito que com DOX é necessária uma concentração 10 vezes superior de Ps35, logo, a DOX demonstra uma maior citotoxicidade para esta linhagem tumoral.

Devido ao facto do composto em solução poder formar duas espécies secundárias (Ag₂O e o ligando tpms) e sendo que estas poderiam ser responsáveis pelo efeito citotóxico do Ps35, foi analisado o potencial citotóxico de cada composto individualmente e em conjunto em A2780. Com o Ag₂O foi

testado o valor do IC₅₀ do Ps35 e 1/10 desse valor (0,04 e 0,004 µM, respectivamente), com o ligando foi testado unicamente o valor do IC₅₀ do Ps35 (0,04 µM) assim como na análise do potencial citotóxico destas duas espécies em conjunto. Em todas as concentrações testadas tanto com o Ag₂O como com o tpms como com estas duas espécies em solução a viabilidade celular obtida foi perto dos 100% (figura 3.5).

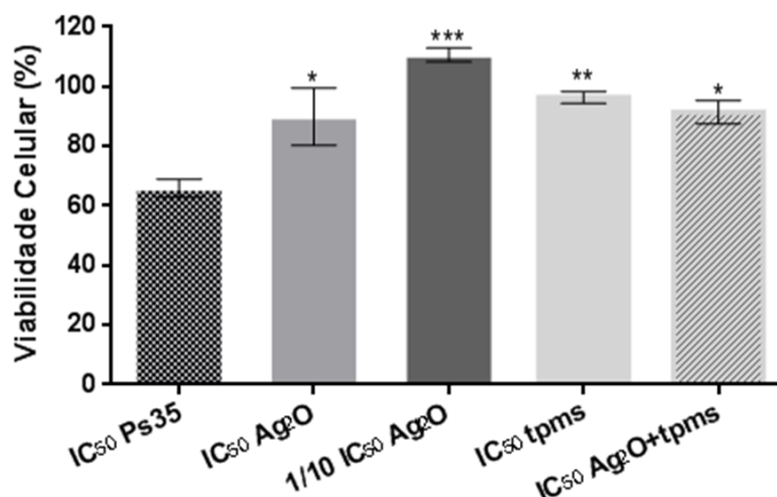


Figura 3.5 - Viabilidade celular na linha celular A2780 após 48 horas de exposição aos compostos: Ps35, Ag₂O, tpms e Ag₂O+tpms. Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao veículo de controle (0,1 % (v/v) DMSO). Os dados estão representados como média ± SEM de dois ensaios biológicos e a significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (IC₅₀ Ps35) pelo método *one-way* ANOVA (* p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001).

Assim, o composto Ps35 demonstra uma grande citotoxicidade contra a linha A2780 (IC₅₀=0,04 µM) apresentando um potencial terapêutico elevado (*in vitro*) pois a esta concentração a viabilidade celular dos fibroblastos (linha celular não tumoral) não é afetada. Devido a esse facto selecionou-se esta linha celular que deriva de um carcinoma de ovário para prosseguir os ensaios biológicos.

3.3. Adesão Celular

O ensaio da adesão celular foi realizado para compreender se existia alguma perda de células aquando da realização dos ensaios onde são efetuadas lavagens. Uma das ações da prata é a capacidade de se ligar às proteínas que existem nas membranas tanto de células animais como de bactérias (Lansdown 2002). Esta ligação poderá alterar a conformação das proteínas membranares afetando a adesão da célula ao substrato.

Neste ensaio foram contabilizadas as células que estavam aderentes e não aderentes e ainda foi possível de entre cada uma dessas fazer a distinção entre células viáveis e não viáveis. Foram contabilizadas células após estarem a incubar com o IC₅₀ do Ps35 ou 0,1% DMSO (v/v) por 3, 24 e 48 horas, estando os resultados obtidos apresentados na tabela 3.2 sobre a forma de percentagens.

Tabela 3.2 - Variação da adesão celular na linhagem A2780 após 3, 24 ou 48 horas de exposição ao IC₅₀ do Ps35. Os dados representados em percentagem estão expressos como a média \pm SEM de dois ensaios biológicos.

	3h		24h		48h	
	0,1% DMSO (v/v)	IC ₅₀ Ps35	0,1% DMSO (v/v)	IC ₅₀ Ps35	0,1% DMSO (v/v)	IC ₅₀ Ps35
Células Aderentes Viáveis	91,8 \pm 5,2	77,5 \pm 7,1	88,6 \pm 3,9	57,3 \pm 11,2	85,8 \pm 1,3	51,7 \pm 5,0
Células Aderentes <u>não</u> Viáveis	7,6 \pm 4,7	9,1 \pm 2,6	10,5 \pm 3,6	28,6 \pm 6,1	12,9 \pm 0,6	30,5 \pm 2,1
Células <u>não</u> Aderentes Viáveis	0,6 \pm 0,5	11,5 \pm 2,8	0,9 \pm 0,3	13,2 \pm 4,6	1,3 \pm 0,7	11,7 \pm 5,3
Células <u>não</u> Aderentes <u>não</u> Viáveis	0	1,9 \pm 1,7	0	0,9 \pm 0,5	0	6,1 \pm 1,7

Em relação às células incubadas com 0,1% (v/v) DMSO, a percentagem de células não aderentes é praticamente nula nos três períodos analisados, logo o DMSO nesta concentração não interfere com este parâmetro. Esta análise também confirma que nesta concentração o DMSO não afeta a viabilidade celular pois as percentagens celulares não se alteram existindo praticamente 90% de células viáveis nos três períodos de incubação.

Como espectável, a percentagem de células aderentes viáveis ao longo dos tempos de incubação com o composto Ps35 vai diminuindo e em oposição a percentagem de células aderentes não viáveis vai aumentando. Este resultado demonstra a ação do composto nas células aderentes com a perda da viabilidade celular. Em relação às células não aderentes viáveis a percentagem de células logo às 3 horas de incubação é um pouco superior aos 10 % sendo que este valor ao longo dos tempos analisados não sofre muitas alterações rondando sempre os 10%. Este resultado demonstra que o efeito na adesão é praticamente imediato estando provavelmente relacionado com a libertação de iões prata do composto (Lansdown 2002; Iqbal et al. 2013). Esta ação não é incremental, ou seja, não existe um aumento na percentagem de células não aderentes viáveis. Isto poderá ser, provavelmente, devido ao facto dos iões de prata formarem Ag₂O e este precipitar deixando de estar disponível para interagir com as proteínas. As células não viáveis e não aderentes existem em muito baixas percentagens exceto às 48 horas onde atingem os 6 %. No geral, verifica-se que o composto leva a um aumento do número de células não aderentes e que, com o decorrer do tempo, deixam de estar viáveis.

3.4. Potencial apoptótico

Após determinar o potencial citotóxico do composto, sendo este representado pelo IC₅₀ na linha celular estudada, é importante perceber qual o mecanismo de morte celular induzida pelo composto.

Muitos dos fármacos utilizados atualmente em quimioterapia induzem o seu efeito antitumoral pela ativação da apoptose nas células tumorais (Simone Fulda and Debatin 2004; Silva et al. 2014). Assim foi analisada a morte celular por apoptose como uma das possíveis ações do composto Ps35.

3.4.1. Marcação com Hoechst e IP

Como análise preliminar da capacidade do Ps35 de induzir apoptose, recorreu-se à microscopia de fluorescência com o uso do Hoescht 33258 e IP. O Hoescht 33258 cora todo o núcleo pois consegue atravessar a membrana plasmática indo-se ligar com grande afinidade a zonas ricas em adeninas e timidinas, emitindo fluorescência azul (X. Zhang et al. 1999). Esta capacidade permite avaliar alterações morfológicas no núcleo, como a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear, típicas de células em apoptose (Silva et al. 2014; Mendo et al. 2015). Por outro lado o uso do IP permite identificar células em necrose pois a sua capacidade de ligação ao DNA está dependente da perda de integridade da membrana plasmática, sendo que quando a membrana plasmática colapsa o IP liga-se aos ácidos nucleicos com grande afinidade emitindo fluorescência vermelha (Brun et al. 2012).

Neste ensaio as células em apoptose ou necrose foram contabilizadas após estarem a incubar com o IC₅₀ do Ps35 ou 0,1 % DMSO (v/v) durante 48 horas. Na figura 3.6 estão imagens representativas de cada tratamento. O DMSO a 0,1 % (v/v) foi utilizado como controlo negativo do ensaio e como se pode ver na imagem as células marcadas com Hoescht apresentam, na grande maioria, uma distribuição homogénea da fluorescência azul, representando a distribuição uniforme da cromatina por todo o núcleo. Células com esta forma de fluorescência foram consideradas viáveis (Z. Ma et al. 2016). Na imagem de células incubadas com Ps35 já existem várias células (assinaladas com uma seta) em que a distribuição da fluorescência não é homogénea, sendo que se encontram zonas ao longo do núcleo com uma maior intensidade de fluorescência azul. Estas células foram consideradas como estando em apoptose, pois estas zonas de maior intensidade de fluorescência representam a condensação e fragmentação da cromatina (Z. Ma et al. 2016). Em relação à marcação com o IP não existiu sinal nas células incubadas com o composto. Isto leva a crer que o composto não induz necrose nas células pois não ocorreu a degradação da membrana plasmática às 48 horas de incubação com o mesmo.

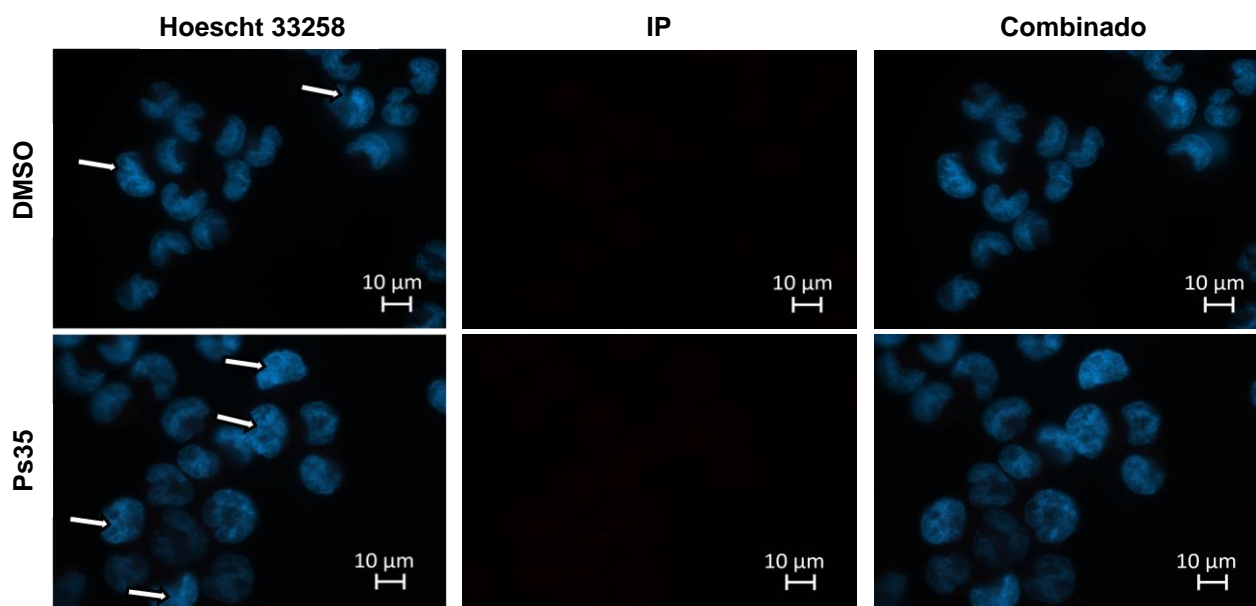


Figura 3.6 - Células da linha tumoral A2780 marcadas com Hoechst 33258 e IP para a visualização de células apoptóticas/necróticas. As células cresceram na presença de 0,1 % (v/v) DMSO (controlo) ou do IC₅₀ do composto por 48 horas. As setas indicam células que apresentam condensação e fragmentação da cromatina. Estes resultados resultam de dois ensaios independentes onde foram analisadas pelo menos 5 imagens para cada condição em estudo.

Como forma de quantificar as células em apoptose, os núcleos apoptóticos das células tratadas com DMSO e o Ps35 foram contabilizados e os valores passados a percentagem de células em apoptose (figura 3.7). Observamos que com o composto se obteve perto de 40 % de células em apoptose enquanto com o controlo negativo o valor foi perto dos 20 %, logo existiu o dobro de células com alterações morfológicas típicas de células em apoptose quando expostas ao Ps35.

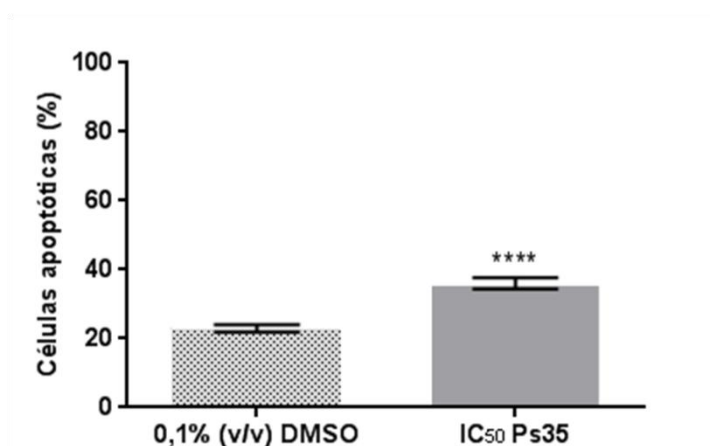


Figura 3.7 - Percentagem de células com alterações morfológicas típicas de células em apoptose na linhagem A2780 após exposição ao IC₅₀ do composto Ps35 após 48 horas de exposição. Os resultados estão representados como a média \pm SEM de dois ensaios independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (controlo) pelo método *t-student* (**** $p \leq 0.0001$).

Dado que foi utilizado o valor do IC₅₀ do composto para esta linha celular a percentagem de células com núcleos apoptóticos deveria ser cerca de 50% (e não 40%). Poderemos especular que as células estão a morrer por apoptose, e com o aumento do número de núcleos contados, um valor mais perto

dos 50% seria atingido. Outra hipótese seria que, a perda de viabilidade celular observada no ensaio de citotoxicidade, se dever às células estarem a morrer não só por apoptose, mas também por outras vias como a autofagia, visto que a hipótese de ser por necrose foi já excluída.

3.4.2. Marcação com AnexinaV-FITC e IP

Por forma a confirmar os resultados obtidos no ensaio anterior, recorreu-se à citometria de fluxo com a dupla marcação com anexinaV-FITC e IP pois permite quantificar com uma elevada especificidade e sensibilidade as células em apoptose/necrose. A anexina-V faz parte de uma família de proteínas com a capacidade de se ligar a fosfolípidos, sendo que a anexina-V apresenta uma grande afinidade para a fosfatidilserina (PS). Este fosfolípido encontra-se unicamente na camada interna da bicamada fosfolípídica sendo externalizado quando a célula entra em apoptose. A externalização da PS é um evento relativamente cedo no processo apoptótico ocorrendo antes de se dar a perda da integridade da membrana plasmática. Neste ensaio a anexina-V é conjugada com o fluoróforo FITC por forma a ser possível a deteção da ligação da anexina-V à fosfatidilserina. Como nos estádios iniciais da apoptose a membrana plasmática ainda não perdeu a integridade a utilização de IP vai permitir distinguir entre células em apoptose inicial e células em apoptose tardia, pois não vai marcar as primeiras, mas vai marcar as últimas onde se consegue ligar ao DNA. Assim, é possível distinguir entre células saudáveis (FITC⁻ / IP⁻), células em apoptose inicial (FITC⁺ / IP⁻), células em apoptose tardia (FITC⁺ / IP⁺) e células em necrose (FITC⁻ / IP⁺) (Hollville and Martin 2016; Brumatti, Sheridan, and Martin 2008; Brun et al. 2012).

Neste ensaio devido à dificuldade de se obter marcação com a linha celular A2780 foi utilizada a linha celular HCT116 e o IC₅₀ do composto obtido com a mesma (4,7 µM) às 48 horas de incubação. Foi realizado o controlo negativo (0,1 % DMSO (v/v)) e ainda um controlo positivo utilizando 0,4 µM de DOX. A DOX foi utilizada como controlo positivo pois a sua ação antitumoral é por indução de apoptose (S. Fulda and Debatin 2006).

O controlo negativo evidencia uma percentagem de células viáveis de 76 %, enquanto que com o composto Ps35 as células viáveis foram 49 %; sendo que existiram 47 % de células em apoptose inicial e 4 % de células em apoptose tardia. Com a DOX obteve-se 60 % de células em apoptose inicial e 13 % de células em apoptose tardia. Em todas as condições a percentagem de células em necrose foi praticamente zero (figura 3.8).

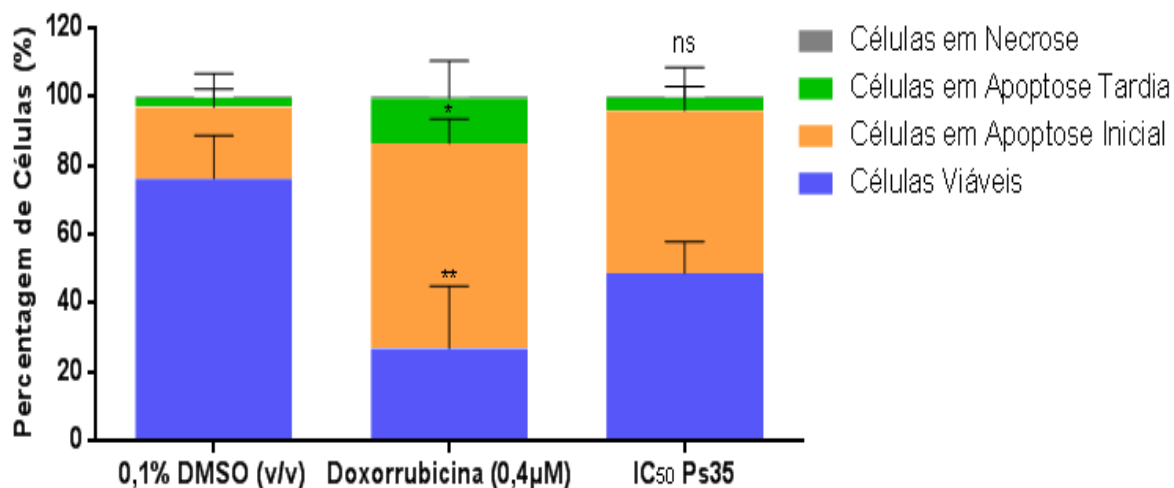


Figura 3.8 - Quantificação das células HCT116 em apoptose por de citometria de fluxo com a marcação dupla com Anexina-FITC e IP. As células HCT116 foram expostas ao IC₅₀ para esta linha celular (4,7 µM), a 0,1 % de (v/v) DMSO (controle) e a 0,4 µM de DOX por 48 horas. Os dados estão representados como a média ± SEM de dois ensaios biológicos. A significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (controle) pelo método *two-way ANOVA* (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ns - estatisticamente não significativo).

Este ensaio confirma os resultados obtidos anteriormente (ver secção 3.4.1), sendo a apoptose um dos mecanismos de morte celular induzida pelo composto Ps35 (a maioria das células encontra-se em apoptose inicial). Em nenhum dos ensaios se observou a indução de necrose. Este é um resultado bastante interessante pois, em quimioterapia, compostos que induzam necrose vão aumentar o nível de inflamação na zona do tumor enquanto a apoptose induz a morte celular causando um mínimo de dano e inflamação (Tait, Ichim, and Green 2014).

3.4.3. Alteração do potencial de membrana mitocondrial

A alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é um parâmetro crucial na indução da apoptose, principalmente pela via intrínseca. Este evento é induzido por uma variedade de estímulos, incluindo a translocação da proteína BAX do citoplasma para a mitocôndria o que leva à perda do $\Delta\Psi_m$ através da permeabilização da membrana mitocondrial, com a consequente libertação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma. Esta perda tem sido ligada com a iniciação e ativação de cascatas apoptóticas. Por esta razão, a mitocôndria é um organelo chave na apoptose e a alteração do $\Delta\Psi_m$ um importante parâmetro da função mitocondrial. Este parâmetro é bastante utilizado em ensaios científicos como um indicador da saúde celular (Mantena, Sharma, and Katiyar 2006).

Como forma de avaliar a alteração do $\Delta\Psi_m$ foi utilizada a sonda catiónica lipofílica JC-1. Esta acumula na mitocôndria de uma forma dependente do $\Delta\Psi_m$ e a alteração na fluorescência é baseada na sua agregação. Em células saudáveis com um elevado $\Delta\Psi_m$ o JC-1 forma agregados dentro da mitocôndria que vão emitir uma intensa fluorescência vermelha. Por outro lado, em células com um baixo $\Delta\Psi_m$ o JC-1 mantém a sua forma monomérica no citoplasma apresentado fluorescência verde (Perelman et al. 2012).

A figura 3.9 apresenta imagens representativas dos resultados obtidos após 48 horas de incubação com IC₅₀ do composto Ps35 ou 0,1 % DMSO (v/v) e ainda um controle com células não tratadas. Nos três casos existe uma intensa fluorescência vermelha indicando que as células apresentam um elevado $\Delta\Psi_m$.

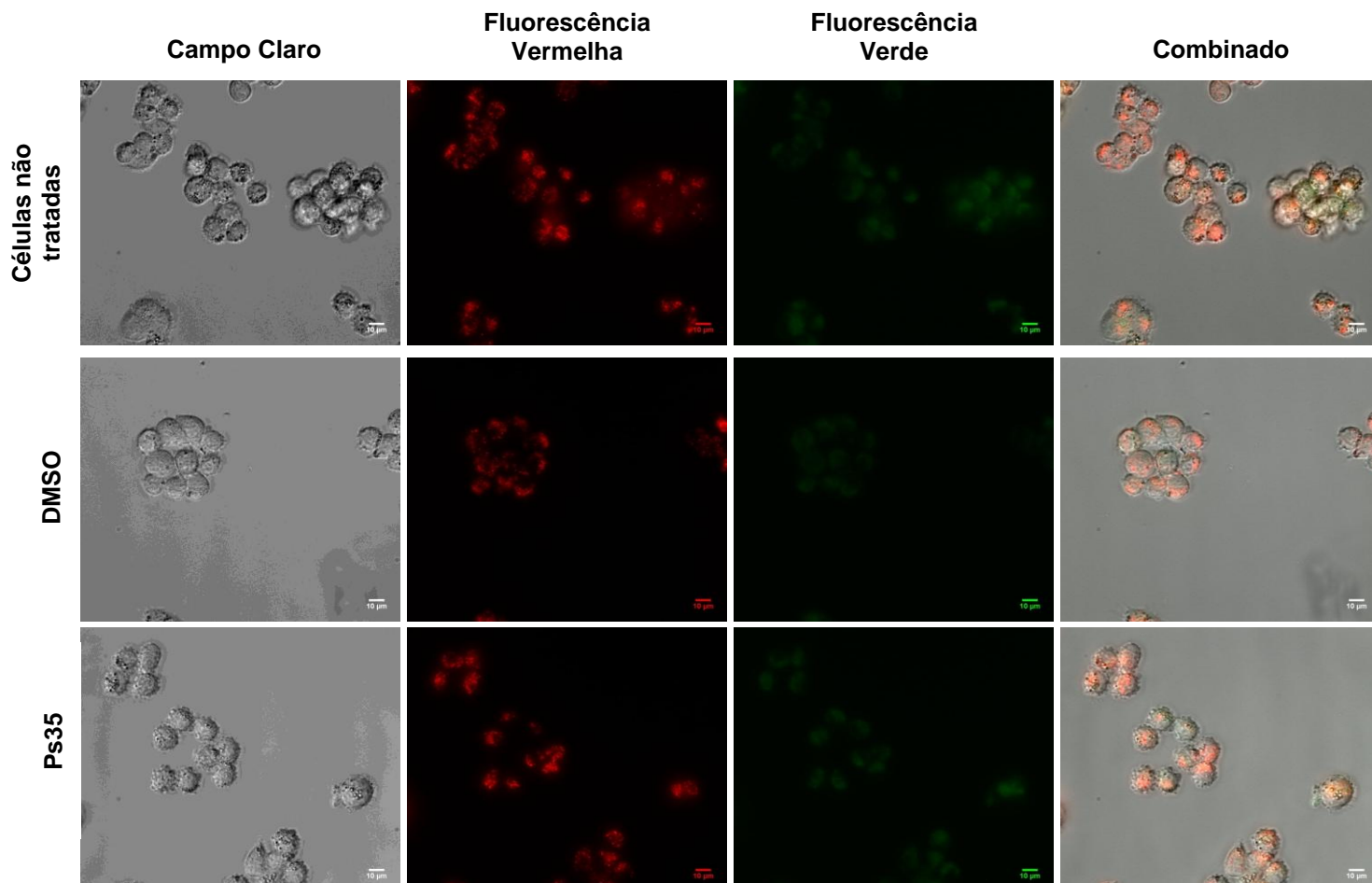


Figura 3.9 - Células da linha tumoral A2780 marcadas com a sonda JC-1 para análise do efeito do composto no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). As células foram incubadas na presença do IC₅₀ do Ps35, com 0,1 % (v/v) DMSO (controle) ou com meio completo (células não tratadas), por 48 horas. Estes resultados resultam de dois ensaios independentes onde foram analisadas pelo menos 5 imagens para cada condição em estudo.

No entanto, a presença do composto Ps35 parece induzir um aumento ligeiro da fluorescência verde em algumas células, o que poderá indicar uma alteração ao $\Delta\Psi_m$. Para analisar com maior detalhe, a fluorescências das células foi quantificada e calculado o rácio fluorescência verde/vermelha. Quanto menor o valor do rácio, maior será o $\Delta\Psi_m$. Como podemos ver na figura 3.10, o valor do rácio para as células não tratadas e para as células tratadas com 0,1 % DMSO (v/v) ronda os 0,5. Com o composto Ps35, apesar da diferença não ser significativa, existe um ligeiro aumento no rácio, ou seja, apesar de em todas as células existir uma predominância da fluorescência vermelha, a fluorescência verde aumentou ligeiramente comparativamente aos controlos.

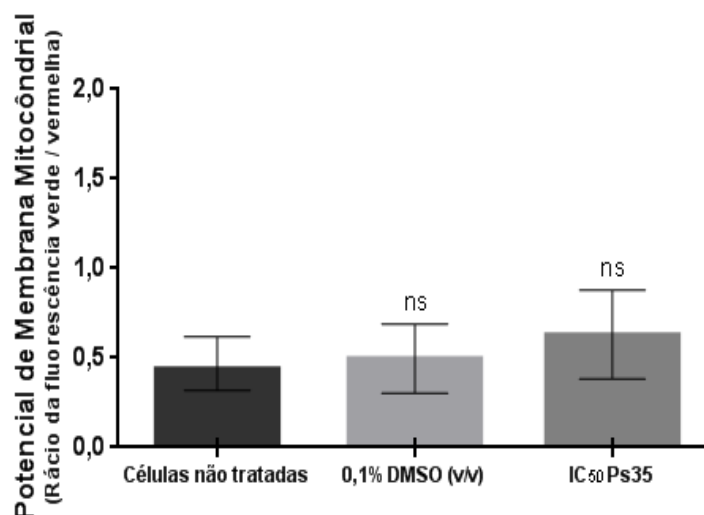


Figura 3.10 - Rácio da fluorescência verde/vermelha do potencial de membrana mitocondrial. As células A2780 foram incubadas na presença do IC₅₀ do Ps35, com 0,1% (v/v) DMSO (controle) ou com meio completo (células não tratadas), por 48 horas. Os dados estão representados como a média \pm SEM de dois ensaios independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (DMSO, controle) pelo método *one-way ANOVA* (ns - estatisticamente não significativo).

Este resultado pode indicar que a alteração do $\Delta\Psi_m$ não se dá numa fase inicial da apoptose ocorrendo numa fase mais tardia. Assim podemos estar perante apoptose que ocorra pela via extrínseca. No entanto, não se pode excluir a hipótese da apoptose ser ativada pela via intrínseca pois existem casos descritos onde ocorreu um aumento do $\Delta\Psi_m$ que levou à libertação do citocromo c sendo que a perda do $\Delta\Psi_m$ só ocorreu numa fase mais tardia do processo apoptótico (Ly, Grubb, and Lawen 2003; Scarlett et al. 2000).

3.4.4. Produção de espécies reativas de oxigénio

Um aumento excessivo na produção de ROS pode provocar dano a lípidos, proteínas e principalmente ao DNA. O dano causado ao DNA através da oxidação poderá resultar na sua clivagem sendo que se a célula não for capaz de reparar esta quebra na cadeia é ativada a morte celular por apoptose. A acumulação de ROS está também relacionada com alterações na mitocôndria onde estas levam à disrupção do $\Delta\Psi_m$ com a libertação de proteínas mitocondriais (citocromo c) para o citoplasma e a consequente ativação das caspases. Assim o aumento de ROS está relacionado diretamente (através da alteração do $\Delta\Psi_m$) e/ou indiretamente (através da clivagem oxidativa do DNA) com a indução da apoptose pela via intrínseca (Eloy et al. 2012; Chen et al. 2003).

No sentido de se elucidar a relação entre a citotoxicidade do composto Ps35 e a produção de ROS na linha celular A2780 foi utilizado a diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA). A DCF-DA é uma sonda estável não polar que entra na célula onde forma outro composto não fluorescente (DCFH) após clivagem por esterases intracelulares. A DCFH passa a diclorofluoresceína (DCF), forma altamente fluorescente, quando oxidado por ROS intracelulares (A. Silva et al. 2013). Assim a intensidade da fluorescência pode ser correlacionado com a quantidade de ROS existentes nas células (Eloy et al. 2012).

Neste ensaio foi utilizado como controlo positivo H_2O_2 devido ao seu elevado potencial em oxidar o meio intracelular e gerar ROS. Assim as células incubaram durante 48 horas com o IC_{50} do composto Ps35 ou 0,1% DMSO (v/v) ou 25 μM H_2O_2 sendo que na figura 3.11 estão imagens representativas dos resultados obtidos. Como esperado nas células tratadas com H_2O_2 houve uma intensa fluorescência verde devido ao aumento da produção de ROS. Em contrapartida tanto no controlo negativo (DMSO) como com o composto Ps35 a fluorescência verde foi mínima.

Como forma de quantificar este ensaio foi medida a intensidade da fluorescência e normalizada em relação ao valor do controlo negativo (figura 3.12). Com esta quantificação rapidamente se confirma que o composto Ps35 não induziu um aumento na produção de ROS. Este resultado é concordante com o facto do potencial de membrana mitocondrial não ter sofrido alterações visto que, apesar da mitocôndria ser um local de produção de ROS também é um dos seus alvos.

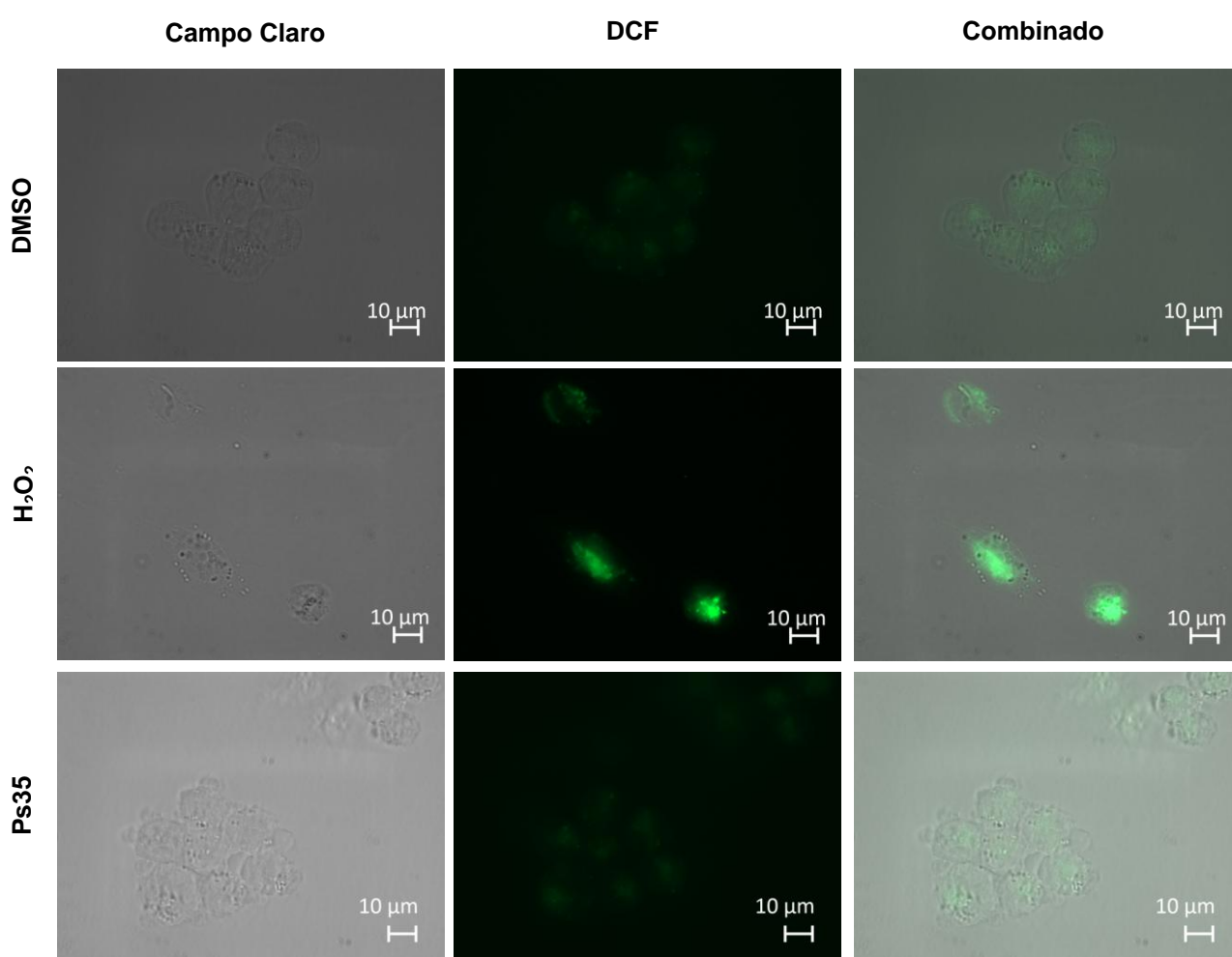


Figura 3.11 - Células da linha tumoral A2780 marcadas com o corante $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ para análise do aumento de produção de ROS. As células foram incubadas com o IC_{50} do Ps35 ou com 0,1 % (v/v) DMSO (controlo) ou com 25 μM de H_2O_2 (controlo positivo) por 48 horas. Estes resultados resultam de dois ensaios independentes onde foram analisadas pelo menos 5 imagens para cada condição em estudo.

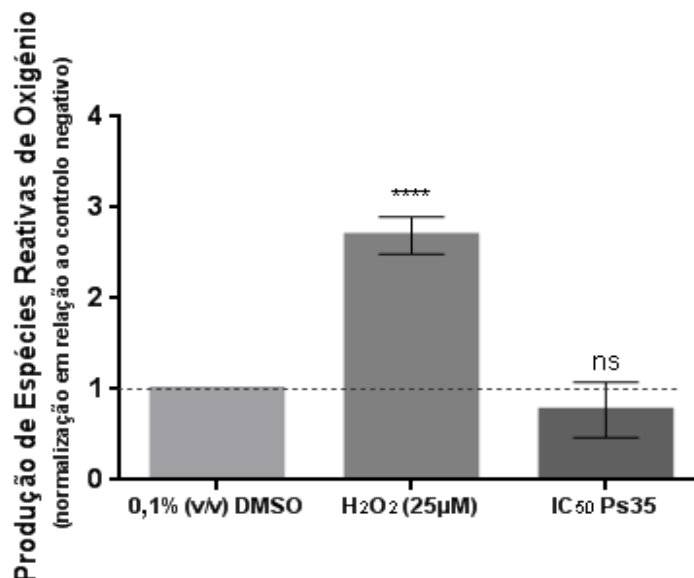


Figura 3.12 - Quantificação da intensidade de fluorescência do corante H₂DCF-DA na linha celular A2780. As células foram incubadas com o IC₅₀ do Ps35 ou com 0,1 % (v/v) DMSO (controle) ou com 25 µM de H₂O₂ (controle positivo) por 48 horas. Os dados estão representados como a média ± SEM e foram normalizados em relação ao controle (0,1 % (v/v) DMSO). A significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de controle (0,1 % (v/v) DMSO) pelo método *one-way ANOVA* (**** $p \leq 0.0001$, ns - estatisticamente não significativo).

Neste sentido, uma vez mais, estes resultados sugerem que a indução de apoptose poderá ser pela via extrínseca e não pela mitocondrial.

3.4.5. Proteínas anti- e pro-apoptóticas por *Western blot*

A via intrínseca da apoptose é regulada pelas proteínas da família BCL-2, constituída por reguladores pro-apoptóticos (por exemplo: BAX) e anti-apoptóticos (por exemplo: BCL-2). Estas proteínas controloam o processo apoptótico: os membros anti-apoptóticos bloqueiam a libertação do citocromo c, assim como outras proteínas, da mitocôndria; os membros pro-apoptóticos estimulam essa libertação (Z. Ma et al. 2016). Assim um aumento da expressão da proteína BAX está associado com a indução da apoptose pela via intrínseca, enquanto que o aumento de expressão da proteína BCL-2 está associada com mecanismo de sobrevivência celular (Katiyar, Roy, and Baliga 2005).

Na figura 3.13 **(A)**, pode-se ver a expressão relativa da proteína BAX e BCL-2 após 48 horas de incubação com o IC₅₀ do Ps35 em A2780. Apesar da expressão da proteína BAX ser ligeiramente superior à proteína BCL-2, esta diferença não é significativa. Mais importante do que analisar a expressão destas proteínas individualmente é calcular do rácio entre as mesmas visto que a apoptose é um processo altamente dependente dessa relação (Z. Ma et al. 2016; Mendo et al. 2015). Na figura 3.13 **(B)** é apresentado o rácio BAX/BCL-2 obtido após 48 horas de incubação com 0,1 % (v/v) DMSO (controle) e o IC₅₀ do Ps35. O rácio das células incubadas com o controle e com o composto foi perto de 1. Isto significa que os níveis da proteína BAX são idênticos à expressão da proteína BCL-2 logo o mecanismo de apoptose pela via intrínseca não foi ativado.

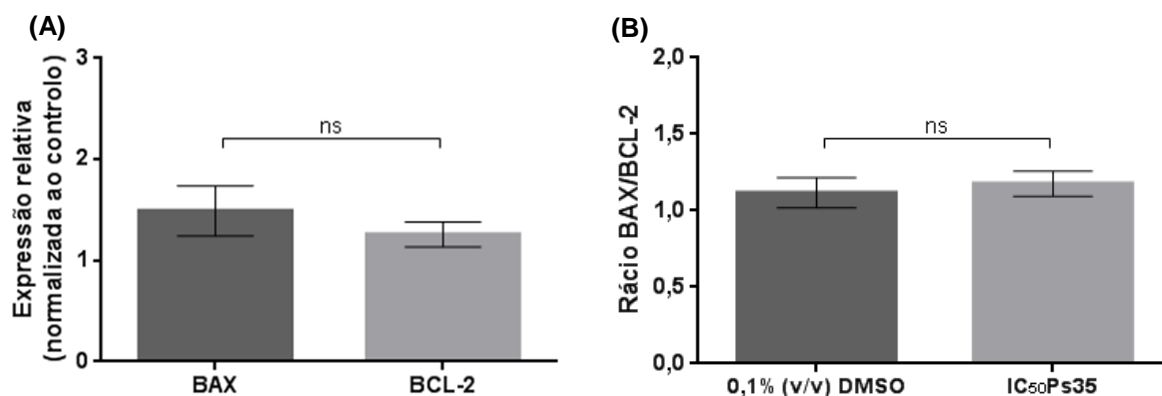


Figura 3.13 – (A) Níveis de expressão de BAX e BCL-2 em células A2780 após incubação por 48 horas com o IC₅₀ do Ps35. **(B)** Rácio BAX/BCL-2 em células A2780 após incubação por 48 horas com 0,1 % (v/v) DMSO (controlo) e o IC₅₀ do Ps35. Dados relativizados face ao controlo após normalização em relação ao western blot da β -actina. Os dados estão representados como a média \pm SEM de dois ensaios independentes e a significância estatística foi avaliada pelo método *t-student* (ns – estatisticamente não significativo).

Os resultados obtidos permitem concluir que às 48 horas de incubação na presença do composto Ps35 a via ativada não será a via intrínseca mas possivelmente a via extrínseca da apoptose. No entanto isto não significa que em algumas células não seja ativada a via intrínseca através da proteína Bid.

3.5. Autofagia

Como a maioria dos compostos metálicos descritos exercem o seu efeito citotóxico através da indução da apoptose, o processo alternativo de indução de morte celular por autofagia, tem emergido recentemente, como um processo atrativo para exercer o efeito citotóxico dos compostos. A autofagia é um processo que pode ser acelerado por uma variedade de *stress* celulares como a falta de nutrientes, danos ao DNA ou a organelos. Assim em condições de aumento de *stress* intracelular ou devido a um fator externo, uma elevada acumulação de vacúolos autofágicos e consequente eliminação de organelos impede a célula de um funcionamento normal resultando na morte da mesma (Slator et al. 2017).

Assim, para se analisar o possível aumento de autofagia devido ao composto Ps35 foi utilizado a sonda Cyto-ID. Esta marca com grande precisão compartimentos autofágicos, ou seja, autofagossomas e autofagolisossomas. Assim as células A2780 foram sujeitas durante 48 horas ao IC₅₀ do composto Ps35 ou 0,1 % DMSO (v/v) ou ainda 0,5 mM rapamicina. A rapamicina serve como controlo positivo pois induz um aumento da autofagia através da inibição do mTOR (Van Limbergen et al. 2009). Como se pode ver na figura 3.14, com os compartimentos autofágicos marcados a verde, a indução de autofagia pelo composto Ps35 é comparável ao aumento de autofagia provocado pela rapamicina.

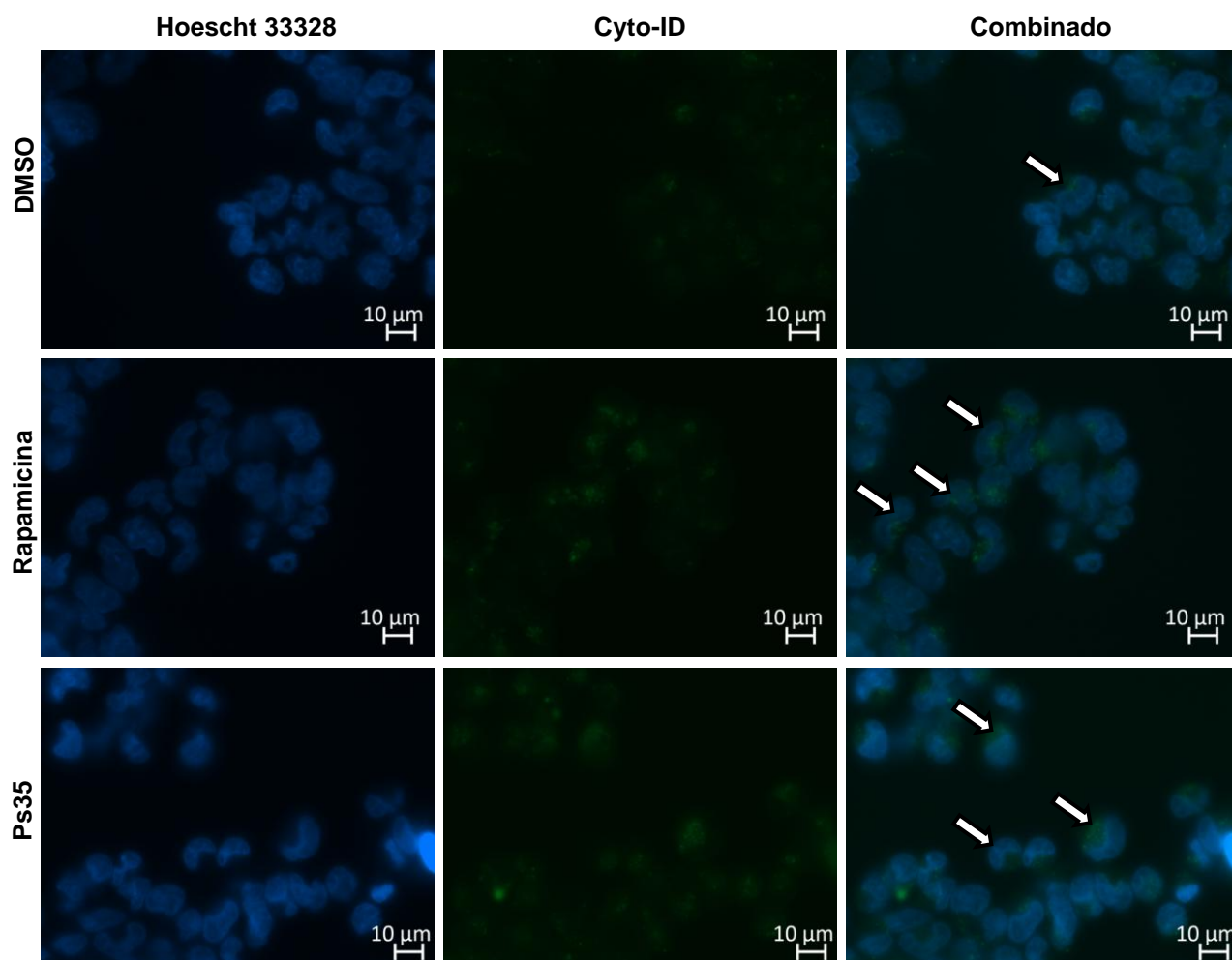


Figura 3.14 - Células da linha tumoral A2780 marcadas com a sonda Cyto-ID para análise dos compartimentos autofágicos. As células foram incubadas com o IC₅₀ do Ps35 ou com 0,1 % (v/v) DMSO (controlo), por 48 horas, ou com 0,5 mM de rapamicina (controlo positivo) por 24 horas. Células com um aumento de autofagossomas/autofagolisossomas estão assinaladas com uma seta. Estes resultados resultam de dois ensaios independentes onde foram analisadas pelo menos 5 imagens para cada condição em estudo.

Após calcular a percentagem de células que apresentam compartimentos autofágicos (figura 3.15) vemos que com o composto Ps35 existem quase 80 % de células em autofagia. Este resultado indica que o composto Ps35 induz um nível superior de autofagia do que apoptose nas células A2780.

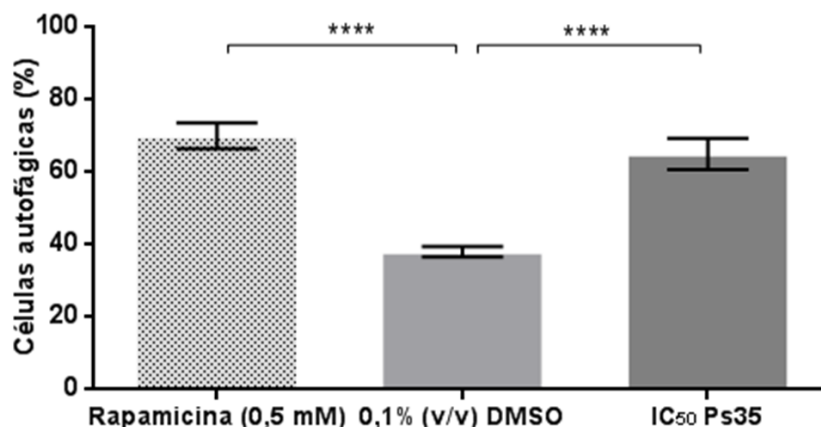


Figura 3.15 - Percentagem de células com compartimentos autofágicos na linha celular A2780. As células foram incubadas com o IC₅₀ do Ps35 ou com 0,1 % (v/v) DMSO (controlo), por 48 horas, ou com 0,5 mM de rapamicina (controlo positivo) por 24 horas. Os resultados estão representados como a média \pm SEM de dois ensaios independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de controlo (0,1 % (v/v) DMSO) pelo método *one-way ANOVA* (**** $p \leq 0.0001$).

A co-ativação da apoptose e da autofagia acontece em quase todos os compostos metálicos, com a exceção de alguns compostos de platina (O. A. Lenis-Rojas et al. 2016; Sutradhar et al. 2017). O paradigma atual na investigação da autofagia, relacionada com o cancro, é considerado complexo e um pouco contraditório: i) por um lado pode atuar como um mecanismo supressor da carcinogénese; ii) por outro lado é sabido que promove a sobrevivência do tumor em situações de falta de nutrientes ou hipoxia; iii) por fim a eficiente indução da autofagia pode ser explorada como um mecanismo de ativação de morte celular em células tumorais, particularmente em células resistentes à ativação de apoptose (Slator et al. 2017; Dalby et al. 2010). Assim, é necessário realizar mais estudos com o composto Ps35. O aumento na autofagia observado com a realização deste ensaio é a resposta da célula a um *stress* e pode ter dois desfechos opostos: servir como um mecanismo celular de sobrevivência ou induzir a morte celular.

3.6. Progressão do Ciclo Celular

A citotoxicidade dos compostos metálicos é muitas vezes associada com danos ao DNA, que em última instância vão induzir a morte celular através da apoptose pela ativação da via intrínseca. Danos ao DNA estão normalmente relacionados com paragens na progressão do ciclo celular, sendo que células nestas condições vão acumular na fase G1, S ou G2/M (Eloy et al. 2012).

Assim, de forma a analisar o potencial citostático do composto Ps35, as células A2780 foram sincronizadas na fase G1/S com um duplo bloqueio com timidina. De seguida foram incubar 9, 12 e 24 horas com o IC₅₀ do composto Ps35 ou 0,1 % (v/v) DMSO em meio sem timidina por forma a permitir a continuação do ciclo celular. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo sendo feita a quantificação do DNA por célula com recurso ao uso da sonda fluorescente IP. Os resultados estão representados na tabela 3.3 e na figura 3.16.

Tabela 3.3 - Percentagem de células A2780, na fase G0/G1, S e G2/M, quando exposta ao IC₅₀ do Ps35 e a 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo) durante 9, 12 ou 24 horas. As células foram analisadas por citometria de fluxo após marcação com IP. Os dados estão representados como a média \pm SEM de dois ensaios independentes.

	9h		12h		24h	
	0,1% (v/v) DMSO	IC ₅₀ Ps35	0,1% (v/v) DMSO	IC ₅₀ Ps35	0,1% (v/v) DMSO	IC ₅₀ Ps35
G0/G1	54,1 \pm 0,4	50,8 \pm 0,6	61,9 \pm 0,4	59,3 \pm 3,2	60,6 \pm 1,0	54,8 \pm 2,2
S	17,4 \pm 0,9	18,8 \pm 0,9	16,5 \pm 0,7	16,7 \pm 1,0	25,5 \pm 3,1	31,2 \pm 5,5
G2/M	28,5 \pm 1,3	30,9 \pm 0,4	21,6 \pm 1,1	23,9 \pm 2,3	13,9 \pm 2,1	14,0 \pm 3,4

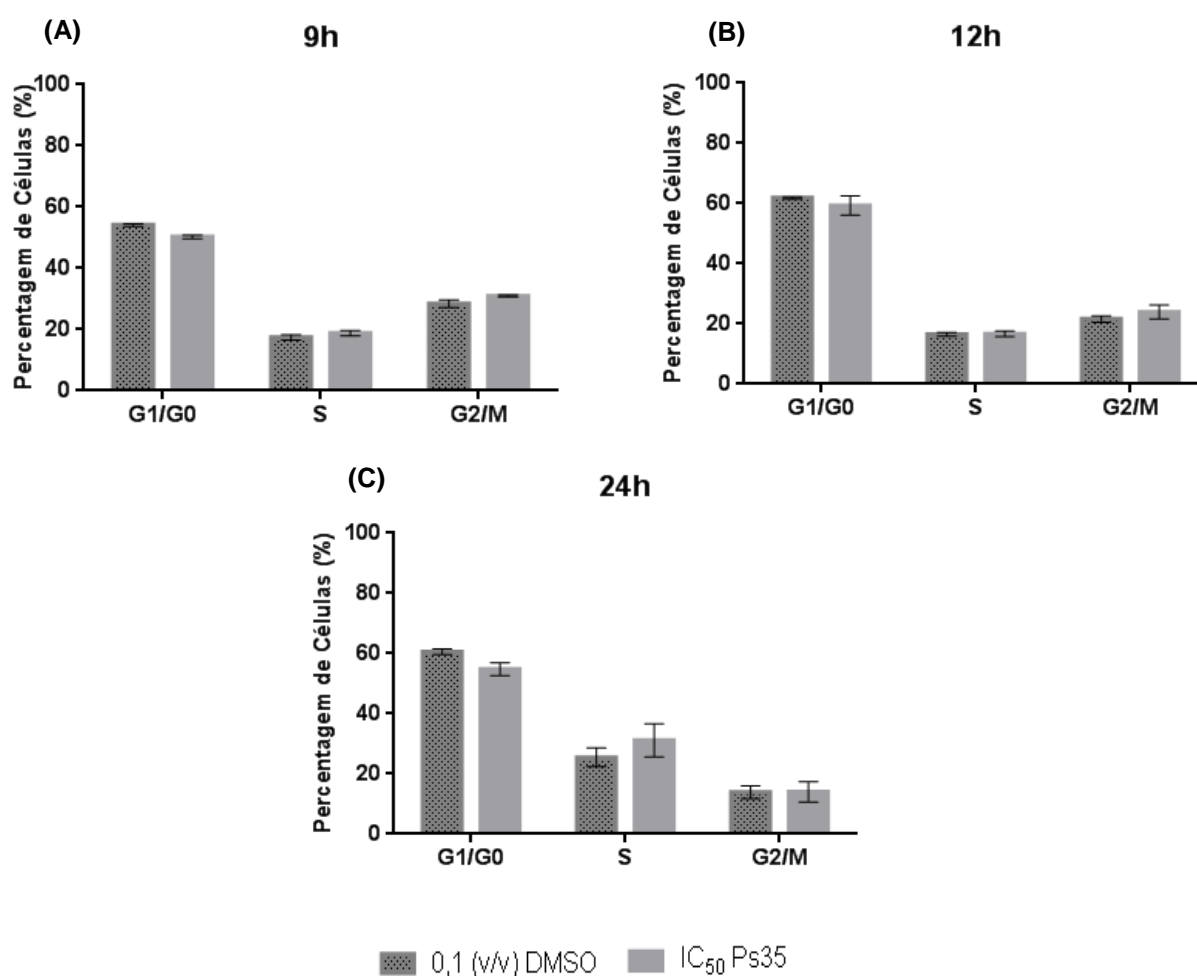


Figura 3.16 – Alteração na progressão do ciclo celular nas células A2780 após exposição ao IC₅₀ do Ps35 e a 0,1 % (v/v) de DMSO, por 9 horas (A), 12 horas (B) e 24 horas (C). As células foram analisadas por citometria de fluxo após marcação com IP. Os dados estão representados como a média \pm SEM de dois ensaios independentes.

Com o controlo negativo (0,1 % (v/v) DMSO) as células que estavam na fase G1/S ao fim de 9 horas progrediram destas fases para a fase G2/M estando muitas já na fase G1/G0. Às 12 horas continua a haver a progressão do ciclo para a fase G1/G0 e ao fim das 24 horas, com o ciclo praticamente concluído as células progridem para a fase S.

As células incubadas com o composto Ps35 seguem o mesmo padrão do controlo negativo, ou seja, não existe nenhuma evidência de atraso na progressão do ciclo celular. Este ensaio exclui o potencial citostático do composto Ps35, pois este não parece afetar a progressão do ciclo celular, nem por interagir com proteínas que o controlam nem por levar a danos no DNA que levariam ao atraso/bloqueio na progressão do ciclo.

3.7. Localização

Como forma de confirmar as conclusões retiradas nos ensaios anteriores recorreu-se à técnica de ICP-AES. Esta técnica é um tipo de espectroscopia de massa altamente sensível sendo capaz de determinar concentrações extremamente baixas de metais e vários não metais (Batsala et al. 2012). Assim foi possível determinar se o composto entra ou não para a célula através da quantificação do metal que o constitui, a prata.

Os resultados indicam que o composto não internaliza, foi detetada 99 % de prata no sobrenadante de células que incubaram com o Ps35, levando uma vez mais a pensar que a apoptose observada nestas células deverá ser ativada pela via extrínseca. Este resultado também é congruente com o facto do composto Ps35 não afetar a progressão do ciclo celular apesar de este interagir com o DNA *in vitro* (resultados descritos na secção seguinte, 3.8).

3.8. Interação do composto com o DNA *in vitro*

Alterar a expressão do DNA através da modulação da transcrição ou por interferência na replicação é o modo de ação de muitos fármacos que atualmente são utilizados em terapia. Existem essencialmente três formas como os fármacos antitumorais podem interagir com o DNA: i) através do controlo de fatores de transcrição ou da polimerase (neste caso os fármacos ligam-se a proteínas que interagem com o DNA); ii) através da ligação do RNA à estrutura de dupla hélice do DNA; iii) através da ligação de compostos à estrutura do DNA. Esta última forma de interação pode dar-se através da formação de ligações covalente e não covalentes. As ligações covalentes são irreversíveis e invariavelmente causam a inibição dos processos relacionados com o DNA, nestas existe a formação de ligações cruzadas inter- ou intracadeia. Nas ligações não covalente, ligações reversíveis, o efeito antitumoral é conseguido através da alteração conformacional, perturbações na estrutura do DNA ou interrupção de ligação de proteínas ao DNA, podendo potencialmente levar a quebras nas cadeias. Estes tipos de ligações dão-se por três vias: ligações electrostáticas, intercalação e ligação aos sulcos do DNA (Sirajuddin, Ali, and Badshah 2013).

O estudo da interação do composto Ps35 com o DNA foi realizado pelo aluno Paulo Faria, sendo aqui interpretados e contextualizados.

O primeiro ensaio realizado foi o de mobilidade eletroforética. Neste estudou-se a interação do Ps35, a concentrações crescentes, e DNA plasmídico. Este ensaio permite analisar a capacidade de intercalação do composto, pois a mobilidade do DNA no gel poderia ser diferente se o composto ao se ligar ao DNA alterar a sua conformação e permite ainda analisar a sua capacidade de hidrolisar o DNA. Os resultados (anexo B, figura 6.2) demonstram que o composto Ps35 não tem a capacidade de alterar a mobilidade eletroforética do DNA plasmídico nem de o clivar. De seguida foram realizados dois ensaios de desnaturação térmica cujo objetivo final era a obtenção de curvas de desnaturação de amplicões após incubação com uma concentração fixa de composto. Através da monitorização das reações com espectrofotómetros, é possível observar alterações na temperatura de *melting* do DNA ou na absorvância a 260 nm, o que pode indicar a existência de interação. No ensaio de *melting* de alta resolução foram obtidas temperaturas de *melting* sendo que foi no *melting* a altas temperaturas que se observou uma diferença de quase 10 °C entre os amplicões incubados com o DMSO ($T_m=75-82$ °C) e os amplicões incubados com o Ps35 ($T_m=90$ °C) (anexo B, figura 6.3). Este resultado indica que o composto pode estar a interagir com os amplicões sendo que estabiliza a sua estrutura em cadeia dupla e consequentemente aumenta a sua temperatura de *melting*. Por forma a confirmar este resultado foi obtido através de espectroscopia de UV-Visível e um aumento controlado de temperatura, um conjunto de curvas de *melting* sendo efetuado a monitorização de alterações ao nível do espectro do DNA, no comprimento de onda onde este absorve com maior intensidade (260 nm). Quando se analisa os perfis de *melting* das amostras incubadas sem o composto existe um aumento progressivo da absorvância a partir dos 80 °C. Pelo contrário nas amostras incubadas com o Ps35 a partir dos 70 °C observa-se uma queda na absorvância da amostra, seguida de uma estabilização (anexo B, figura 6.4). Assim é possível afirmar que existe uma interação entre o DNA e o Ps35 visto que na presença do composto não ocorre uma desnaturação normal do DNA. Estes dados vêm confirmar os resultados obtidos por C. Pettinari *et al.* (Pettinari *et al.* 2011) onde através de estudo de fluorescência comprovaram a interação deste composto com o DNA. No entanto, apesar destes resultados observados *in vitro*, não se observou qualquer efeito nas células e na progressão do ciclo celular.

Assim com estes resultados podemos afirmar que o composto Ps35 interage com o DNA *in vitro* mas com as técnicas utilizadas não é possível concluir sobre o tipo de interação que está a ocorrer entre o composto e o DNA.

3.9. Interação do composto com a albumina de soro bovino (BSA) e humana (HSA) *in vitro*

A distribuição, concentração livre e o metabolismo de vários fármacos é fortemente influenciado pelas interações entre os fármacos e as proteínas existentes no sangue. A albumina é a proteína que existe em maior concentração no sistema circulatório de uma grande variedade de organismos sendo que contribui na manutenção da pressão osmótica do sangue. Devido à sua capacidade de ligar reversivelmente a uma variedade de substâncias, esta proteína é capaz de transportar compostos endógenos e exógenos podendo afetar a estabilidade, toxicidade e distribuição dos mesmos, sendo

que muitas vezes é capaz de aumentar a solubilidade aparente de fármacos hidrofóbicos no plasma. Assim esta proteína é considerada um bom modelo *in vitro* para o estudo da interação de fármacos em desenvolvimento com as proteínas do soro (Fanali et al. 2012; Naik, Chimatadar, and Nandibewoor 2010; Topală et al. 2014).

O estudo da interação do composto Ps35 com a albumina foi realizado pela aluna Sara Murilhas sendo aqui interpretados e contextualizados.

A BSA é muito utilizada em estudos iniciais de interação devido ao facto de ter sido extensivamente caracterizada e ser quimicamente e estruturalmente semelhante à HSA. Assim no primeiro ensaio utilizou-se BSA recorrendo-se a espectroscopia de UV-Visível onde existiu uma concentração fixa de BSA e concentrações crescente de Ps35. Os resultados obtidos (anexo C, figura 6.6) indicam a existência de uma interação, após incubação a 37 °C durante 24 horas, entre o composto e a albumina pois existiram alterações na absorvância da albumina na presença do composto. Nestes ensaios de interação, geralmente uma mudança na conformação da proteína é a principal responsável pela variação da absorvância. O próximo ensaio realizado foi o de espectroscopia de fluorescência onde foi utilizada a HSA. Esta proteína tem múltiplos locais para a ligação, tanto para compostos hidrofóbicos como para metais, sendo que os principais *binding sites* para compostos farmacêuticos denominados de *site 1* e *2* encontrando-se localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respetivamente. Neste ensaio recorreu-se à fluorescência intrínseca da albumina, onde o único resíduo de triptofano da HSA localizado no subdomínio IIA funciona como fluoróforo (Zhivkova 2015; D. Silva et al. 2004). Este resíduo é muito sensível a variações locais e por isso alterações no espectro de fluorescência estão associadas com alterações conformacionais ou interações entre o fármaco e a HSA (Naik, Chimatadar, and Nandibewoor 2010; D. Silva et al. 2004). Os resultados obtidos (anexo C, figura 6.7) comprovam a interação do composto com a HSA, após 24 horas de incubação a 37 °C, pois com concentrações superiores de composto existiu uma maior fluorescência por parte da HSA. Esta tendência de intensidade crescente pode ser justificada com o facto do composto ao se ligar à proteína alterar a sua conformação que resultará numa exposição superior do fluoróforo. Os resultados de fluorescência indicam que o local mais provável para a alteração da conformação será pela ligação do Ps35 ao *binding site 2* da proteína. Esta hipótese foi confirmada no último ensaio (anexo C, tabela 6.2) onde foi realizada uma simulação computacional de *docking* molecular através do programa Autodock. A interação entre o Ps35 e a albumina do soro sugere que o composto poderá ser transportado por esta pelo sistema circulatório indo-se acumular no local do tumor de forma passiva. Esta é uma característica importante para composto antitumorais pois influencia a seletividade do composto contra células tumorais.

3.10. Proteómica

Com o objetivo de estudar as vias celulares afetadas pela presença do composto Ps35, procedeu-se ao estudo da avaliação da expressão proteica nas células tumorais A2780 após exposição ao IC₅₀ do composto durante 48 horas, através da técnica de proteómica. Esta técnica, apesar de complexa, fornece uma ideia geral da resposta da célula à morte celular induzida pelo composto.

Os géis 2D obtidos foram analisados no programa Melanie 7.0 e comparados com o gel de referência HCT116 (anexo D, figura 6.8) (Gomes et al. 2018) de forma a determinar a variação dos níveis de expressão das proteínas identificadas. Foi utilizado este gel visto que é o gel com mais proteínas identificadas no laboratório *Human Genetics and Cancer Therapeutics*, UCIBIO (DCV, FCT-UNL). O nível de expressão de cada proteína foi calculado pela razão entre a intensidade do spot do composto e a intensidade do spot no controlo (DMSO), valores inferiores a 0,7 foram considerados sub-expressos e valores superiores a 1,5 sobre-expressos.

Globalmente foram identificadas 753 proteínas nos géis das células A2780 expostas a 0,1 % (v/v) DMSO (controlo) e ao IC₅₀ do Ps35. Destas proteínas, 51 % não sofreu alteração na expressão sendo que 49 % exibiu variação, onde 22 % foram sub-expressas e 27 % foram sobre-expressas (figura 3.17).

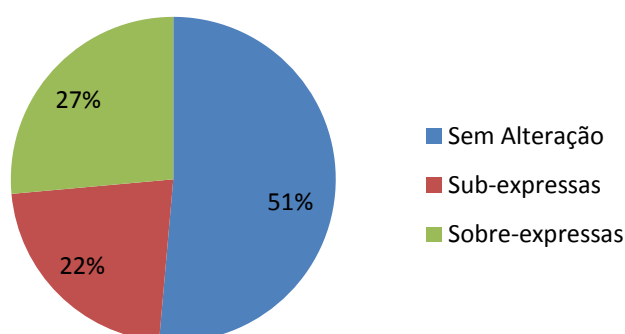


Figura 3.17 - Variação no nível da expressão das proteínas na linha tumoral A2780 exposta ao Ps35, estando representado a percentagem de proteínas sub-expressas (<0,7) e sobre-expressas (>1,5), assim como as proteínas sem alteração de expressão significativa ($0,7 \leq \text{fold} \leq 1,5$).

Devido ao facto do gel de referência pertencer a uma linha celular diferente, a identificação das proteínas foi complicada, sendo que apenas algumas das proteínas expressas foram identificadas. O número de proteínas que foi possível identificar e que exibiram diferenças na expressão das proteínas estão representadas na tabela 3.4 e na figura 3.18. Através da análise bioinformática e bases de dados, as proteínas identificadas foram classificadas baseado na sua função. A classificação das proteínas em relação à sua função foi feita através do uso do STRING 10.5 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) e da UniProt (*Universal Protein Resource*).

Tabela 3.4 - Proteínas identificadas nos géis resultantes de eletroforese bidimensional com a identificação da variação de expressão relativamente ao controlo. Valores inferiores a 0,7 (vermelho) foram considerados sub-expressão e valores superiores a 1,5 (verde) foram considerados sobre-expressão.

Identificação da Proteína (Abreviatura)	Variação da Expressão	Função Molecular
<i>Cytosol aminopeptidase 3</i> (AMPL)	0,6	Componente <i>turnover</i>
<i>Annexin A2</i> (ANXA2)	1,9	Resposta a <i>stress</i>
<i>ATP synthase subunit beta</i> (ATP5B)	3,9	Metabolismo
<i>Calumenin</i> (CALU)	1,7	Processos metabólicos das proteínas celulares
<i>Glutamate dehydrogenase 1</i> (DHE3)	0,6	Componente <i>turnover</i>
<i>Ezrin</i> (EZRI)	0,6	Mobilidade do citoesqueleto
<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i> (GDIR1)	0,6	Controlo da homeostasia das proteínas Rho
<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i> (HSP7C)	0,5	Resposta a <i>stress</i> e <i>chaperone</i>
<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i> (HSP90B)	0,4	Resposta a <i>stress</i> e <i>chaperone</i>
<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i> (IF4A1)	0,6	Tradução de sinal
<i>Pyrroline-5-carboxylate reductase 1</i> (P5CR1)	0,7	Resposta a <i>stress</i>
<i>Proliferation-associated protein 2G4</i> (PA2G4)	0,5	Regulação do crescimento
<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (PCNA)	0,4	Regulação do crescimento
<i>Phosphoglycerate mutase 1</i> (PGAM1)	1,7	Glicólise
<i>Prohibitin</i> (PHB)	3,6	Regulador da atividade mitocondrial
<i>Histone-binding protein RBBP7</i> (RBBP7)	3,3	Fator remodelador da cromatina
<i>40S ribosomal protein SA</i> (RSSA)	1,9	Ligação ao ribossoma
<i>Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha</i> (SGTA)	0,4	Resposta a <i>stress</i> e <i>chaperone</i>
<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i> (STIP1)	1,8	Ligação a <i>chaperone</i>
<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i> (TCPA)	2,8	Resposta a <i>stress</i> e <i>chaperone</i>
<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i> (TCPG)	3,6	Resposta a <i>stress</i> e <i>chaperone</i>
<i>T-complex protein 1 subunit theta</i> (TCPQ)	0,2	Resposta a <i>stress</i> e <i>chaperone</i>

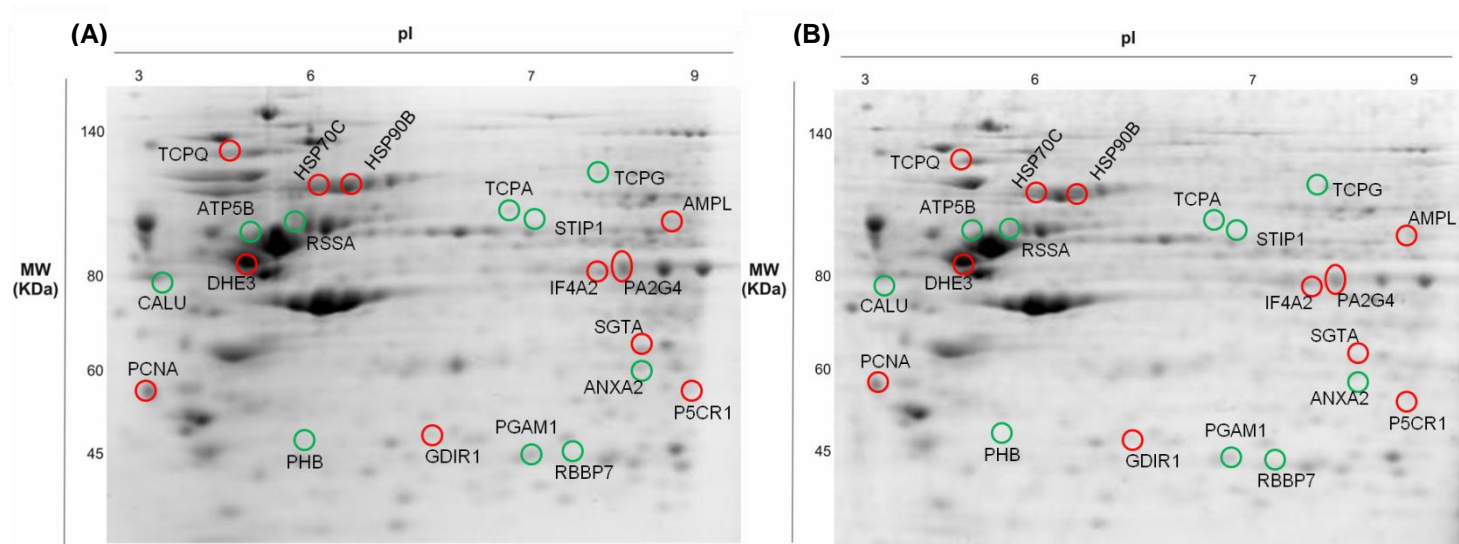


Figura 3.18 - Géis resultantes de eletroforese bidimensional de extratos proteicos de células tumorais A2780. As células foram incubadas com **(A)** 0,1 % (v/v) de DMSO ou **(B)** IC_{50} do Ps35 durante 48 horas. Os géis foram analisados no programa Melanie 7.0. Os spots identificados representam proteínas com respetiva sigla do nome. As proteínas sobre-expressas estão representadas pelos círculos verde e as proteínas sub-expressas pelos círculos a vermelho.

As proteínas afetadas pela adição do composto foram identificadas através de diferenças significativas na sua expressão comparativamente às proteínas das células controlo. Dentro deste grupo, a maioria estão relacionadas com respostas ao *stress* e proteínas chaperoninas.

As chaperoninas são complexos moleculares essenciais no *folding* de proteínas. Este grupo, bastante diverso, de proteínas tem como função a proteção da célula. Assim síntese de chaperoninas pode ser induzida por fatores fisiológicos e patológicos, como o choque térmico, stress oxidativo, inflamação ou infeção. Estas proteínas estão presentes no citosol, na mitocôndria, no retículo endoplasmático, no núcleo e na membrana plasmática (Garrido et al. 2001).

Um exemplo destas proteínas é o complexo TCP1 (*T-complex protein 1*), constituído pelas subunidades TCPA e TCPG (entre outras) (Freund et al. 2014). Estas proteínas apresentam sobre-expressão após incubação com o Ps35, o que sugere um aumento do metabolismo e *folding* de proteínas nas células A2780, como uma resposta ao *stress* a que estas são sujeitas por influência do Ps35.

A ATP5B é uma proteína envolvida na catálise da síntese de ATP na mitocôndria (Rustin and Kroemer 2013). Os resultados obtidos indicam que, após exposição das células A2780 ao composto, este provoca uma sobre-expressão da proteína ATP5B no interior da célula. Isto provavelmente deve-se ao facto de que em resposta a estímulos, como neste caso o composto Ps35, o metabolismo das células diferencia-se de modo a combater a alteração a que é submetido, neste caso aumentando. Nesse sentido, a sobre-expressão da ATP5B pode ser a resposta da célula ao *stress* no sentido de fornecer ATP para todas as atividades metabólicas. Este resultado vem de encontro ao aumento de expressão das proteínas TCPA e TCPG (que hidrolisam ATP) e aos resultados obtidos em ensaios

anteriores onde não existiu uma alteração do potencial de membrana mitocondrial sendo que assim as mitocôndrias das células não viram a sua atividade metabólica muito afetada.

A sub-expressão das proteínas DHE3 (enzima envolvida na regulação da atividade metabólica (Derry et al. 2014)) e AMPL (proteína envolvida no *turnover* de proteínas (Matsushima et al. 1991)) poderá significar que a célula tenta manter a homeostase metabólica.

Por outro lado, no grupo das proteínas de resposta a *stress* encontram-se a HSP90 e a HSP70. As células que incubaram com o Ps35 apresentaram uma sub-expressão das proteínas HSP70 e HSP90. De acordo com a literatura a sub-expressão da HSP70 é, em determinados casos, suficiente para matar as células tumorais mas geralmente essa sub-expressão auxilia a ação de compostos que induzam apoptose (Ravagnan et al. 2001). A HSP90 está envolvida na regulação de estabilização pós-traducional e funcional de um diverso número de proteínas que se sabem ser de importância vital no processo tumoral. Devido a este facto, atualmente existe uma investigação intensa em terapias que possam inibir esta proteína (Whitesell and Lin 2012). O facto do composto Ps35 induzir uma sub-expressão da HSP90 promove uma diminuição de expressão de proteínas essenciais para a célula tumoral, e consequentemente um aumento de *stress* na célula. Relativamente à HSP70, o seu *folding* é auxiliado pela proteína co-chaperoninas SGTA (Paul et al. 2014), pelo que o grau de expressão desta afetará consequentemente a expressão de HSP70. Assim, os resultados obtidos, que apontam para a sua sub-expressão serão por isso congruentes com a expressão diminuta da HSP70.

Outra proteína de resposta a *stress* cuja expressão apresentou valores alterados designa-se de ANXA2. Esta proteína é responsável pela regulação do estado redox da célula, devido a um resíduo de cisteína que tem na sua constituição, facilmente oxidado por H₂O₂ (Madureira and Waisman 2013). A sobre-expressão desta proteína poderia significar que o composto Ps35 induz *stress* oxidativo nas células, embora nenhum dos ensaios realizados corrobore esta hipótese. Assim, o aumento de expressão observado pode estar relacionado com uma resposta adaptativa de resistência ao composto por parte da célula, uma vez que, a proteína ANXA2 é um marcador de resistência a fármacos (Wang and Lin 2014). Por outro lado, este aumento pode estar associado à sobre-expressão da proteína RSSA, uma proteína ribossomal que também está envolvida na resistência a múltiplos fármacos (Yao et al. 2009). Uma outra proteína envolvida na resposta a *stress* oxidativo é a proteína P5CR1 que é um importante controlo da apoptose (Li et al. 2017). A sua sub-expressão vai de encontro aos resultados obtidos, nos quais existe a ativação da apoptose nas células sem um aumento da produção de ROS.

A CALU é uma proteína de ligação a Ca²⁺ pertencente à família CREC. Esta proteína encontra-se normalmente no retículo endoplasmático, no entanto pode ser transportada para o citoplasma após a paragem do ciclo celular ou em apoptose tardia, apresentando-se reduzida no citoplasma durante a fase inicial da apoptose (Bull et al. 2010). Após a exposição ao Ps35, observou-se uma sobre-expressão desta proteína nas células A2780, o que indica que as células se encontram em apoptose. Este resultado em conjunto com os resultados da dupla marcação com Anexina V-FITC e IP, parecem indicar que as células estarão a fazer uma progressão entre apoptose inicial e tardia. O

aumento de expressão da proteína PHB também vai a encontro da indução da apoptose na presença do Ps35 (L. Zhang et al. 2012). Apesar dos resultados desta tese indicarem que o composto induz apoptose pela via extrínseca a sobre-expressão da proteína PHB poderá indicar alguma indução da apoptose via proteína Bid.

A GDIR1 apresenta um importante papel no controlo de várias funções celulares através da interação com a família de GTPases, na qual se insere a Rac1. A GDIR1 forma um complexo com a Rac1 impedindo que esta seja clivada pela caspase 3 mantendo a Rac1 no seu estado ativo. Assim esta proteína encontra-se sobre-expressa em alguns tipos de células tumorais onde vai promover a resistência das células à apoptose induzida por agentes quimioterapêuticos (B. Zhang et al. 2005). Neste caso, a sub-expressão da GDIR1 indica que as células são susceptíveis à apoptose induzida pelo composto, uma vez que a falta de GDIR1 deixa a Rac1 exposta à clivagem por parte da caspase 3, sendo este um evento essencial para a indução da apoptose por um agente anti-tumoral (B. Zhang et al. 2005).

Por fim, a proteína PA2G4 está envolvida na via de tradução de sinal regulada por ERBB3 e na promoção do crescimento celular. É composta por duas isoforma: a isoforma 1 inibe a apoptose e a isoforma 2 promove a proliferação celular (Keene et al. 2012). Como ocorre apoptose após incubação com o composto, a isoforma identificada deve ser a 1 visto que existiu uma diminuição da expressão da proteína que passa a ser insuficiente para bloquear a apoptose.

Globalmente, esta análise de proteómica permitiu identificar dois tipos de resposta das células A2780 ao composto Ps35: a primeira resposta prende-se com a ação antiproliferativa do composto, onde a célula ativa mecanismos que irão induzir a apoptose; a segunda resposta, por parte da célula, está relacionada, precisamente, com o combate à morte celular induzida pelo composto e daí observamos um aumento no metabolismo com maior produção de ATP e síntese de proteína e ainda uma resposta mais específica de resistência a fármacos.

4. Conclusões e Perspetivas futuras

O cancro continua a ser em todo o mundo uma das principais causas de morte sendo que todos os anos o número de casos aumenta, seja devido ao crescimento da população ou ao seu envelhecimento. A quimioterapia tem demonstrado ser altamente eficaz em prolongar o tempo de vida do paciente e em determinados casos erradicar certos tipos dos tumores. No entanto, apresenta duas importantes desvantagens: causa toxicidade nos tecidos saudáveis originando efeitos secundários severos e as células tumorais acabam por desenvolver resistência aos fármacos, sendo que o paciente deixa de responder à terapia o que levará à evolução do tumor. Uma das formas de ultrapassar o problema da resistência foi através do desenvolvimento de protocolos com múltiplos fármacos em que se combinam fármacos com modos de ação distintos. Este facto impulsionou a síntese de novas moléculas, tendo a química organo-/inorgano- metálica adquirido grande relevância neste campo.

A caracterização do potencial antiproliferativo do composto em estudo, tris(pirazolil)metanosulfonato de prata, foi realizado em duas linhas tumorais humanas, nomeadamente a A2780 (linha derivada de um carcinoma do ovário) e HCT116 (linha derivada de um carcinoma colorretal), tendo demonstrado citotoxicidade em ambas. No entanto o potencial antiproliferativo do composto na linha A2780 é bastante superior, sendo necessário uma concentração bastante inferior para afetar a mesma percentagem de células, comparativamente à linha HCT116. Como forma de analisar a citotoxicidade do Ps35 em células não tumorais recorreu-se a fibroblastos, sendo que foram testadas as mesmas concentrações de composto que se utilizaram na linha HCT116. Para avaliar o desempenho deste composto foi calculado o IC_{50} para cada linha celular. Assim, selecionou-se a linha A2780 para prosseguir os ensaios biológicos pois o composto apresentou o menor IC_{50} nesta (0,04 μM) e ainda devido ao facto da viabilidade dos fibroblastos (linha celular saudável) não ser afetada a esta concentração.

No estudo do mecanismo de citotoxicidade do composto foi demonstrado que: i) este interfere com a aderência das células ao substrato, sendo este efeito praticamente imediato e muito provavelmente, relacionado com a libertação de iões prata do composto; ii) o principal mecanismo de morte celular ativado pelo composto é a apoptose, pois nos ensaios com Hoechst e IP foi observada condensação e fragmentação da cromatina no núcleo, típico de células em apoptose e que com a dupla marcação com a anexina V-FITC e IP obteve-se uma morte celular de 50 % sendo que a maioria das células se encontravam em apoptose inicial. Como forma de identificar qual o mecanismo de indução de apoptose por parte do composto Ps35 realizaram-se os ensaios de alteração do potencial de membrana mitocondrial, aumento na produção de espécies reativas de oxigénio e alteração na expressão de proteínas pro- e anti-apoptóticas, nomeadamente a BAX e a BCL-2. Nos três ensaios realizados, os resultados apontam para uma indução da apoptose via extrínseca e/ou intrínseca via Bid. Esta hipótese foi apoiada com os resultados obtidos através da técnica de ICP-AES em que foi detetada prata unicamente no sobrenadante das células; outro mecanismo de morte celular que poderia estar a atuar nas células é a autofagia. Esta foi confirmada pelo aumento de compartimentos

autofágicos nas células incubadas com o composto. No entanto é necessário realizar mais estudos, pois o aumento na autofagia é a resposta da célula a um *stress* e pode acabar por ter dois resultados opostos: servir como um mecanismo celular de sobrevivência ou induzir a morte celular; o potencial citostático do composto Ps35 foi excluído, pois este não parece afetar a progressão do ciclo celular; ainda assim foi comprovado *in vitro* que o composto interage com o DNA, apesar de não se ter conseguido concluir sobre o tipo de ligação; o composto apresenta ainda a capacidade de interagir com a albumina, sugerindo que o composto poderá ser transportado por esta pelo sistema circulatório.

Por fim a análise de proteómica realizada às células após 48 horas de incubação com o composto Ps35 permitiu compreender de uma forma global a respostas das células ao mesmo. Assim existe um aumento no metabolismo com maior produção de ATP, visto com o aumento de expressão da ATP5B. Este aumento de ATP vai permitir à célula um aumento no *folding* de proteínas que poderão estar a ser afetadas devido ao *stress* causado pelo composto e ainda, vai permitir à célula iniciar uma resposta da resistência a fármacos (sobre-expressão das proteínas ANXA2 e RSSA). Por outro lado, devido à ação antiproliferativa, do composto existe a ativação da apoptose, e.g. sobre-expressão da PHB e sub-expressão da GDIR1, que no final levará à morte celular.

Em última análise, os resultados demonstram características promissoras para a continuação de estudos sobre o composto Ps35. Em relação à identificação das vias de ação do composto os próximos ensaios terão de passar pela medição da atividade da caspase 8 como forma de confirmar a ativação da via extrínseca e por ensaios de autofagia onde por exemplo esta é bloqueada para se confirmar um aumento ou diminuição de viabilidade celular. No geral, em relação à atividade antiproliferativa do Ps35 e a identificação das possíveis vias de ação em células tumorais, os objetivos para o presente estudo foram alcançados. No entanto, apesar da sua elevada citotoxicidade e seletividade para com células do carcinoma de ovário, a formação de óxido de prata e a falta de estabilidade após solubilização fazem com que o composto em estudo ainda não possa ser utilizado em ensaios *in vivo*. Para superar este problema, seria interessante que projetos futuros procedessem a duas abordagens diferentes: alterar a estrutura do composto ou o projeto de um sistema de *drug delivery*, por exemplo, com o uso de nanopartículas para potenciar a acumulação do composto no local do tumor e/ou permitir um direcionamento ativo para as células tumorais.

5. Bibliografia

- AACR. 2017. "Cancer: A Global Challenge." <http://www.cancerprogressreport-digital.org/cancerprogressreport/2017?pg=18#pg18>. Acedido a 23/06/2018.
- Allardyce, Claire S, and Paul J Dyson. 2016. "Metal-Based Drugs That Break the Rules." *Dalton Transactions* 45 (8): 3201–3209.
- Amaravadi, Ravi K., and Craig B. Thompson. 2007. "The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment." *Clinical Cancer Research* 13 (24): 7271–7279.
- American Cancer Society. 2016. "Cancer Facts & Figures 2016." *Cancer Facts & Figures* 1–9.
- Avril, T, E Vauléon, and E Chevet. 2017. "Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and Chemotherapy Resistance in Solid Cancers." *Oncogenesis* 6 (8): e373.
- Bagherpoorfard, Mina, and Ali R. Soheili. 2018. "A Moving Mesh Method for Mathematical Model of Capillary Formation in Tumor Angiogenesis." *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* 8: 1-9.
- Balakin, Konstantin V, Nikolay P Savchuk, and Igor V Tetko. 2006. "In Silico Approaches to Prediction of Aqueous and DMSO Solubility of Drug-Like Compounds: Trends, Problems and Solutions." *Current Medicinal Chemistry* 13 (2): 223–241.
- Barnum, Kevin J, and Matthew J. O'Connell. 2014. "Cell Cycle Regulation by Checkpoints." *Cell Cycle Control. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1170. Humana Press.
- Batsala, Mahesh, Baburao Chandu, Bhargavi Sakala, Sreekanth Nama, and Sreenu Domatoti. 2012. "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Icp-Ms)." *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* 2 (3): 671–680.
- Baudino, Troy A. 2015. "Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment." *Current Drug Discovery Technologies* 12 (1): 3–20.
- Bertram, John S. 2001. "The Molecular Biology of Cancer." *Molecular Aspects of Medicine* 21 (6): 167–223.
- Bohra, Usha. 2012. "Recent Advances in Management of Epithelial Ovarian Cancer." *Apollo Medicine* 9 (3): 212–218.
- Bruin, Jennifer E., Hertz C. Gerstein, Katherine M. Morrison, and Alison C. Holloway. 2008. "Increased Pancreatic Beta-Cell Apoptosis Following Fetal and Neonatal Exposure to Nicotine Is Mediated via the Mitochondria." *Toxicological Sciences* 103 (2): 362–370.
- Brumatti, Gabriela, Clare Sheridan, and Seamus J. Martin. 2008. "Expression and Purification of Recombinant Annexin V for the Detection of Membrane Alterations on Apoptotic Cells." *Methods* 44 (3): 235–240.
- Brun, Paola, Barbara Zavan, Vincenzo Vindigni, Antonella Schiavinato, Assunta Pozzuoli, Claudio Iacobellis, and Giovanni Abatangelo. 2012. "In Vitro Response of Osteoarthritic Chondrocytes and Fibroblast-like Synoviocytes to a 500-730 KDa Hyaluronan Amide Derivative." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100 (8): 2073–2081.
- Bull, Vibeke H., Ellen M. Fargestad, Margarita Strozynski, and Bernd Thiede. 2010. "Temporal Proteome Profiling of Taxol-Induced Mitotic Arrest and Apoptosis." *Electrophoresis* 31 (11): 1873–1885.
- Carmeliet, Peter, and Rakesh K Jain. 2000. "Angiogenesis in Cancer and Other Diseases." *Nature* 407(6801): 249–257.

- Chambers, Ann F., Alan C. Groom, and Ian C. MacDonald. 2002. "Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites." *Nature Reviews Cancer* 2 (8): 563–572.
- Chen, Q, Y-C Chai, S Mazumder, C Jiang, Rm Macklis, Gm Chisolm, and A Almasan. 2003. "The Late Increase in Intracellular Free Radical Oxygen Species during Apoptosis Is Associated with Cytochrome c Release, Caspase Activation, and Mitochondrial Dysfunction." *Cell death and differentiation* 10 (3): 323–334.
- Cicchini, Michelle, Vassiliki Karantza, and Bing Xia. 2015. "Molecular Pathways: Autophagy in Cancer- A Matter of Timing and Context." *Clinical Cancer Research* 21 (3): 498–504.
- Corrie, Pippa G. 2011. "Cytotoxic Chemotherapy: Clinical Aspects." *Medicine* 39 (12): 717–722.
- Czerwińska, Katarzyna, Barbara Machura, Sławomir Kula, Stanisław Krompiec, Karol Erfurt, Catarina Roma-Rodrigues, Alexandra R. Fernandes, Lidia S. Shul'pina, Nikolay S. Ikonnikov, and Georgiy B. Shul'pin. 2017. "Copper(II) Complexes of Functionalized 2,2':6',2''-Terpyridines and 2,6-Di(Thiazol-2-Yl)Pyridine: Structure, Spectroscopy, Cytotoxicity and Catalytic Activity." *Dalton Transactions* 46 (29): 9591–9604.
- Dalby, Kevin N., Ibrahim Tekedereli, Gabriel Lopez-Berestein, and Bulent Ozpolat. 2010. "Targeting the Prodeath and Prosurvival Functions of Autophagy as Novel Therapeutic Strategies in Cancer." *Autophagy* 6 (3): 322–329.
- Derry, Molly, Ranganatha Somasagara, Komal Raina, Sushil Kumar, Joe Gomez, Manisha Patel, Rajesh Agarwal, and Chapla Agarwal. 2014. "Target Identification of Grape Seed Extract in Colorectal Cancer Using Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) Technique: Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response Proteins." *Current Cancer Drug Targets* 14 (4): 323–336.
- Dickson, Mark A. 2014. "Molecular Pathways: CDK4 Inhibitors for Cancer Therapy." *Clinical Cancer Research* 20 (13): 3379–3383.
- Direção-Geral da Saúde. 2017. "Programa Nacional Para as Doenças Oncológicas." www.dgs.pt. Acedido a 20/03/2018.
- Eloy, Laure, Anne Sophie Jarrousse, Marie Laure Teyssot, Arnaud Gautier, Laurent Morel, Claude Jolival, Thierry Cresteil, and Sylvain Roland. 2012. "Anticancer Activity of Silver-N-Heterocyclic Carbene Complexes: Caspase-Independent Induction of Apoptosis via Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor (AIF)." *ChemMedChem* 7 (5): 805–814.
- Fanali, Gabriella, Alessandra Di Masi, Viviana Trezza, Maria Marino, Mauro Fasano, and Paolo Ascenzi. 2012. "Human Serum Albumin: From Bench to Bedside." *Molecular Aspects of Medicine* 33 (3): 209–290.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W.W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray. 2013. "Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries in 2012." *European Journal of Cancer* 49 (6): 1374–1403.
- Floor, Sébastien L., Jacques E. Dumont, Carine Maenhaut, and Eric Raspe. 2012. "Hallmarks of Cancer: Of All Cancer Cells, All the Time?" *Trends in Molecular Medicine* 18 (9): 509–515.
- Freund, Adam, Franklin L. Zhong, Andrew S. Venteicher, Zhaojing Meng, Timothy D. Veenstra, Judith Frydman, and Steven E. Artandi. 2014. "Proteostatic Control of Telomerase Function through TRiC-Mediated Folding of TCAB1" *Cell* 159 (6): 1389–1403.
- Frezza, Michael, Sarmad Hindo, Di Chen, Andrew Davenport, Sara Schmitt, Dajena Tomco, and Q Ping Dou. 2010. "Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy." *Current Pharmaceutical Design* 16 (16): 1813–1825.
- Fulda, S., and K. M. Debatin. 2006. "Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer

- Chemotherapy." *Oncogene* 25 (34): 4798–4811.
- Fulda, S., and D. Kögel. 2015. "Cell Death by Autophagy: Emerging Molecular Mechanisms and Implications for Cancer Therapy." *Oncogene* 34 (40): 5105–5113.
- Fulda, Simone, and Klaus-Michael Debatin. 2004. "Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy." *Current Cancer Drug Targets* 4 (7): 569–576.
- Galvao, Joana, Benjamin Davis, Mark Tilley, Eduardo Normando, Michael R. Duchon, and M. Francesca Cordeiro. 2014. "Unexpected Low-Dose Toxicity of the Universal Solvent DMSO." *The FASEB Journal* 28 (3): 1317–1330.
- Garrido, Carmen, Sandeep Gurbuxani, Luigi Ravagnan, and Guido Kroemer. 2001. "Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286 (3): 433–442.
- Gawryszewska, Paula, and Piotr Smolenski. 2014. "Ligands: Synthesis, Characterization and Role in Biotechnology." *Biochemistry Research Trends*. Nova Science Publishers, Incorporated.
- Ghavami, S., M. Hashemi, S. R. Ande, B. Yeganeh, W. Xiao, M. Eshraghi, C. J. Bus, et al. 2009. "Apoptosis and Cancer: Mutations within Caspase Genes." *Journal of Medical Genetics* 46 (8): 497–510.
- GLOBOCAN. *World Health Organization*. 2012. "Global Cancer Observatory." https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default. Acedido a 16/05/2018.
- Gomes, Sofia E, Diane M Pereira, Catarina Roma-Rodrigues, Alexandra R Fernandes, Pedro M Borralho, and Cecília M.P. Rodrigues. 2018. "Convergence of MiR-143 Overexpression , Oxidative Stress and Cell Death in HCT116 Human Colon Cancer Cells." *PLOS ONE* 13 (1): e0191607.
- Gorg, Angelica. 2004. "2-D Electrophoresis. Principles and Methods." *Principles and Methods*. GE Healthcare.
- Hanahan, Douglas, and Robert Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–674.
- Hollville, Emilie, and Seamus J. Martin. 2016. "Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Cytometry." *Current Protocols in Immunology* 112 (1): 14–38.
- Ichim, Gabriel, and Stephen W.G. Tait. 2016. "A Fate Worse than Death: Apoptosis as an Oncogenic Process." *Nature Reviews Cancer* 16 (8): 539–548.
- Iqbal, Muhammad Adnan, Rosenani A. Haque, Siti Fatimah Nasri, A. M.S.Abdul Majid, Mohamed B.Khadeer Ahamed, Elham Farsi, and Tabinda Fatima. 2013. "Potential of Silver against Human Colon Cancer: (Synthesis, Characterization and Crystal Structures of Xylol (Ortho, Meta, & Para) Linked Bis-Benzimidazolium Salts and Ag(I)-NHC Complexes: In Vitro Anticancer Studies)." *Chemistry Central Journal* 7 (1): 1–17.
- Jain, Mayur V., Anna M. Paczulla, Thomas Klonisch, Florence N. Dimgba, Sahana B. Rao, Karin Roberg, Frank Schweizer, et al. 2013. "Interconnections between Apoptotic, Autophagic and Necrotic Pathways: Implications for Cancer Therapy Development." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17 (1): 12–29.
- Jiang, Bing-Hua, and Ling-Zhi Liu. 2010. "PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis." *Advances in cancer research* 102: 19–65.

- Katiyar, Santosh K, Anshu M Roy, and Manjeshwar S Baliga. 2005. "Silymarin Induces Apoptosis Primarily through a P53-Dependent Pathway Involving Bcl-2/Bax, Cytochrome c Release, and Caspase Activation." *Molecular Cancer Therapeutics* 4 (2): 207–216.
- Keene, K. L., A. R. Quinlan, X. Hou, I. M. Hall, J. C. Mychaleckyj, S. Onengut-Gumuscu, and P. Concannon. 2012. "Evidence for Two Independent Associations with Type 1 Diabetes at the 12q13 Locus." *Genes and Immunity* 13 (1): 66–70.
- Kläui, Wolfgang, Michael Berghahn, Gerd Rheinwald, and Heinrich Lang. 2000. "A Novel Class of Water-Soluble Ligands." *Angewandte Chemie International Edition* 39 (14): 2464–2466.
- Kläui, Wolfgang, Daniel Schramm, Wilfried Peters, Gerd Rheinwald, and Heinrich Lang. 2001. "Tris (Pyrazolyl)Methanesulfonate (Tpms) - A Versatile Alternative to Tris(Pyrazolyl)Borate in Rhodium(I) Chemistry." *European Journal of Inorganic Chemistry* 2001 (6): 1415–1424.
- Konishi, H., M. Mohseni, A. Tamaki, J. P. Garay, S. Croessmann, S. Karnan, A. Ota, et al. 2011. "Mutation of a Single Allele of the Cancer Susceptibility Gene BRCA1 Leads to Genomic Instability in Human Breast Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (43): 17773–17778.
- Lansdown, A.B.G. 2002. "Silver I: Its Antibacterial Properties and Mechanism of Action." *Journal of Wound Care* 11 (4): 125–130.
- Lenis-Rojas, O. A., A. R. Fernandes, C. Roma-Rodrigues, P. V. Baptista, F. Marques, D. Pérez-Fernández, J. Guerra-Varela, et al. 2016. "Heteroleptic Mononuclear Compounds of Ruthenium(II): Synthesis, Structural Analyses, In Vitro Antitumor Activity and in Vivo Toxicity on Zebrafish Embryos." *Dalton Transactions* 45 (47): 19127–19140.
- Lenis-Rojas, Oscar A., Catarina Roma-Rodrigues, Alexandra R. Fernandes, Fernanda Marques, David Pérez-Fernández, Jorge Guerra-Varela, Laura Sánchez, et al. 2017. "Dinuclear Rull(Bipy)2 Derivatives: Structural, Biological, and in Vivo Zebrafish Toxicity Evaluation." *Inorganic Chemistry* 56 (12): 7127–7144.
- Li, Linhua, Yujia Ye, Peng Sang, Yirui Yin, Wei Hu, Jing Wang, Chao Zhang, et al. 2017. "Effect of R119G Mutation on Human P5CR1 Dynamic Property and Enzymatic Activity." *BioMed Research International* 2017: 1–8.
- Limbergen, J Van, C Stevens, E R Nimmo, D C Wilson, and J Satsangi. 2009. "Autophagy: From Basic Science to Clinical Application." *Mucosal Immunology* 2 (4): 315–330.
- Luqmani, Y.A. 2008. "Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy." *Medical Principles and Practice* 14 (1): 35–48.
- Ly, J D, D R Grubb, and A Lawen. 2003. "The Mitochondrial Membrane Potential in Apoptosis; an Update." *Apoptosis* 8 (2): 115–128.
- Ma, Hoi Tang, and Randy Y C Poon. 2011. "Synchronization of HeLa Cells." *Cell Cycle Synchronization. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 761. Humana Press.
- Ma, Zhen, Bian Zhang, M. Fátima C. Guedes Da Silva, Joana Silva, Ana Soraia Mendo, Pedro Viana Baptista, Alexandra R. Fernandes, and Armando J.L. Pombeiro. 2016. "Synthesis, Characterization, Thermal Properties and Antiproliferative Potential of Copper(II) 4'-Phenyl-Terpyridine Compounds." *Dalton Transactions* 45 (12): 5339–5355.
- Madureira, Patrícia A., and David M. Waisman. 2013. "Annexin A2: The Importance of Being Redox Sensitive." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2): 3568–3594.
- Malvezzi, M., G. Carioli, P. Bertuccio, P. Boffetta, F. Levi, Carlo La Vecchia, and E. Negri. 2018. "European Cancer Mortality Predictions for the Year 2018 with Focus on Colorectal Cancer."

Annals of Oncology 29 (4): 1016–1022.

- Mantena, Sudheer K., Som D. Sharma, and Santosh K. Katiyar. 2006. "Berberine Inhibits Growth, Induces G1arrest and Apoptosis in Human Epidermoid Carcinoma A431 Cells by Regulating Cdk1-Cdk-Cyclin Cascade, Disruption of Mitochondrial Membrane Potential and Cleavage of Caspase 3 and PARP." *Carcinogenesis* 27 (10): 2018–2027.
- Marchi, Saverio, Carlotta Giorgi, Jan M. Suski, Chiara Agnoletto, Angela Bononi, Massimo Bonora, Elena De Marchi, et al. 2011. "Mitochondria-Ros Crosstalk in the Control of Cell Death and Aging." *Journal of Signal Transduction* 2012: 1–17.
- Martins, Luísa M.D.R.S., and Armando J.L. Pombeiro. 2016. "Water-Soluble C-Scorpionate Complexes – Catalytic and Biological Applications." *European Journal of Inorganic Chemistry* 2016 (15–16): 2236–2252.
- Matsushima, Masashi, Takayuki Takahashi, Masao Ichinose, Kazumasa Miki, Kiyoshi Kurokawa, and Kenji Takahashi. 1991. "Structural and Immunological Evidence for the Identity of Prolyl Aminopeptidase with Leucyl Aminopeptidase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 178 (3): 1459–1464.
- Medici, Serenella, Massimiliano Peana, Guido Crisponi, Valeria M. Nurchi, Joanna I. Lachowicz, Maurizio Remelli, and Maria Antonietta Zoroddu. 2016. "Silver Coordination Compounds: A New Horizon in Medicine." *Coordination Chemistry Reviews* 327–328: 349–359.
- Medvetz, Doug A., Khadijah M. Hindi, Matthew J. Panzner, Andrew J. Ditto, Yang H. Yun, and Wiley J. Youngs. 2008. "Anticancer Activity of Ag(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes Derived from 4,5-Dichloro-1H-Imidazole." *Metal-Based Drugs* 2008: 1–7.
- Mendo, Ana Soraia, Sara Figueiredo, Catarina Roma-Rodrigues, Paula A. Videira, Zhen Ma, Mário Diniz, Miguel Larguinho, et al. 2015. "Characterization of Antiproliferative Potential and Biological Targets of a Copper Compound Containing 4'-Phenyl Terpyridine." *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 20 (6): 935–948.
- Mokhtari, Reza Bayat, Tina S Homayouni, Narges Baluch, Evgeniya Morgatskaya, Sushil Kumar, Bikul Das, and Herman Yeger. 2017. "Combination Therapy in Combating Cancer." *Oncotarget* 8 (23): 38022–38043.
- Moolgavkar, Suresh H., and E. Georg Luebeck. 2003. "Multistage Carcinogenesis and the Incidence of Human Cancer." *Genes Chromosomes and Cancer* 38 (4): 302–306.
- Muhammad, Nafees, and Zijian Guo. 2014. "Metal-Based Anticancer Chemotherapeutic Agents." *Current Opinion in Chemical Biology* 19 (1): 144–153.
- Naik, P. N., S. A. Chimatadar, and S. T. Nandibewoor. 2010. "Interaction between a Potent Corticosteroid Drug - Dexamethasone with Bovine Serum Albumin and Human Serum Albumin: A Fluorescence Quenching and Fourier Transformation Infrared Spectroscopy Study." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 100 (3): 147–159.
- National Cancer Institute. 2004. "Cancer and the Environment." *U.S. Department of Health and Human Services*.
- Ndagi, Umar, Ndumiso Mhlongo, and Mahmoud E Soliman. 2017. "Metal Complexes in Cancer Therapy – an Update from Drug Design Perspective." *Drug design, development and therapy* 11: 599–616.
- Niesel, Johanna, Antonio Pinto, Harmel W. Peindy N'Dongo, Klaus Merz, Ingo Ott, Ronald Gust, and Ulrich Schatzschneider. 2008. "Photoinduced CO Release, Cellular Uptake and Cytotoxicity of a Tris(Pyrazolyl)Methane (Tpm) Manganese Tricarbonyl Complex." *Chemical Communications* 15: 1798–1800.

- Otto, Tobias, and Piotr Sicinski. 2017. "Cell Cycle Proteins as Promising Targets in Cancer Therapy." *Nature Reviews Cancer* 17 (2): 93–115.
- Ouyang, L., Z. Shi, S. Zhao, F. T. Wang, T. T. Zhou, B. Liu, and J. K. Bao. 2012. "Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis." *Cell Proliferation* 45 (6): 487–498.
- Papish, Elizabeth T, Michael T Taylor, Finith E Jernigan, Michael J Rodig, Robert R Shawhan, Glenn P A Yap, and Fernando A Jové. 2006. "Synthesis of Zinc, Copper, Nickel, Cobalt, and Iron Complexes Using Tris(Pyrazolyl)Methane Sulfonate Ligands: A Structural Model for N,N,O Binding in Metalloenzymes." *Inorganic Chemistry* 45 (5): 2242–2250.
- Paul, Atanu, Yenni A. Garcia, Bettina Zierer, Chaitanya Patwardhan, Omar Gutierrez, Zacariah Hildenbrand, Diondra C. Harris, et al. 2014. "The Cochaperone SGTA (Small Glutamine-Rich Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein Alpha) Demonstrates Regulatory Specificity for the Androgen, Glucocorticoid, and Progesterone Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 289 (22): 15297–15308.
- Pecorino, Lauren. 2012. "Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics." *Oxford university press*.
- Pedrosa, Pedro, Rita Mendes, Rita Cabral, Luísa M.D.R.S. Martins, Pedro V. Baptista, and Alexandra R. Fernandes. 2018. "Combination of Chemotherapy and Au-Nanoparticle Phototherapy in the Visible Light to Tackle Doxorubicin Resistance in Cancer Cells." *Scientific Reports* 8 (1): 1–8.
- Perelman, A., C. Wachtel, M. Cohen, S. Haupt, H. Shapiro, and A. Tzur. 2012. "JC-1: Alternative Excitation Wavelengths Facilitate Mitochondrial Membrane Potential Cytometry." *Cell Death and Disease* 3 (11): 430–437.
- Pettinari, Claudio, Fabio Marchetti, Giulio Lupidi, Luana Quassinti, Massimo Bramucci, Dezemona Petrelli, Luca a Vitali, et al. 2011. "Synthesis , Antimicrobial and Antiproliferative Activity of Novel Silver (I) Tris (Pyrazolyl) Methanesulfonate And." *Inorganic Chemistry* 50 (1): 11173–11183.
- Philipp-Staheli, Jeannette, Shannon R. Payne, and Christopher J. Kemp. 2001. "P27Kip1: Regulation and Function of a Haploinsufficient Tumor Suppressor and Its Misregulation in Cancer." *Experimental Cell Research* 264 (1): 148–168.
- Pitot, Henry C. 1993. "The Molecular Biology of Carcinogenesis." *Cancer* 72 (S3): 962–970.
- Prabhu, Sukumaran, and Eldho K Poulouse. 2012. "Silver Nanoparticles: Mechanism of Antimicrobial Action, Synthesis, Medical Applications, and Toxicity Effects." *International Nano Letters* 2 (1): 2–32.
- Promega Corporation. 2012. "CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay." *Technical Bulletin*.
- Ravagnan, L, S Gurbuxani, S a Susin, C Maisse, E Daugas, N Zamzami, T Mak, et al. 2001. "Heat-Shock Protein 70 Antagonizes Apoptosis-Inducing Factor." *Nature Cell Biology* 3 (9): 839–843.
- Reid, Brett M., Jennifer B. Permuth, and Thomas A. Sellers. 2017. "Epidemiology of Ovarian Cancer: A Review." *Cancer Biology & Medicine* 14 (1): 9–32.
- Rijt, Sabine H. van, and Peter J. Sadler. 2009. "Current Applications and Future Potential for Bioinorganic Chemistry in the Development of Anticancer Drugs." *Drug Discovery Today* 14 (23–24): 1089–1097.
- Riss, Terry L, Richard A Moravec, Andrew L Niles, Sarah Duellman, Hélène A Benink, Tracy J Worzella, and Lisa Minor. 2016. "Cell Viability Assays." In *Assay Guidance Manual*, 114: 785–796.

- Rosenberg, Barnett, Earl Renshaw, Loretta VanCamp, John Hartwick, and Jaroslav Drobnik. 1967. "Platinum-Induced Filamentous Growth in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 93 (2): 716–721.
- Ruddon, Raymond W. 2007. "Cancer Biology." *Oxford University Press*.
- Rustin, P, and G Kroemer. 2013. "Mitochondria and Cancer." *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings* 4: 1–289.
- Scarlett, J L, P W Sheard, G Hughes, E C Ledgerwood, H H Ku, and M P Murphy. 2000. "Changes in Mitochondrial Membrane Potential during Staurosporine-Induced Apoptosis in Jurkat Cells." *The FEBS Letters* 475 (3): 267–272.
- Sebaugh, J. L. 2011. "Guidelines for Accurate EC50/IC50 Estimation." *Pharmaceutical Statistics* 10 (2): 128–134.
- Shimizu, Shigeomi, Tatsushi Yoshida, Masatsune Tsujioka, and Satoko Arakawa. 2014. "Autophagic Cell Death and Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 15 (2): 3145–3153.
- Silva, Ana, Daniel Luís, Susana Santos, Joana Silva, Ana Soraia Mendo, Lidia Coito, Telma F.S. Silva, et al. 2013. "Biological Characterization of the Antiproliferative Potential of Co(II) and Sn(IV) Coordination Compounds in Human Cancer Cell Lines: A Comparative Proteomic Approach." *Drug Metabolism and Drug Interactions* 28 (3): 167–176.
- Silva, Dílson, Célia M. Cortez, Jayme Cunha-Bastos, and Sônia R.W. Louro. 2004. "Methyl Parathion Interaction with Human and Bovine Serum Albumin." *Toxicology Letters* 147 (1): 53–61.
- Silva, Joana, António Sebastião Rodrigues, Paula A. Videira, Jamal Lasri, Adília Januário Charmier, Armando J.L. Pombeiro, and Alexandra R. Fernandes. 2014. "Characterization of the Antiproliferative Potential and Biological Targets of a Trans Ketoimine Platinum Complex." *Inorganica Chimica Acta* 423: 156–167.
- Sirajuddin, Muhammad, Saqib Ali, and Amin Badshah. 2013. "Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 124: 1–19.
- Slator, Creina, Zara Molphy, Vickie McKee, and Andrew Kellett. 2017. "Triggering Autophagic Cell Death with a Di-Manganese(II) Developmental Therapeutic." *Redox Biology* 12: 150–161.
- Stewart, Zoe A., Matthew D. Westfall, and Jennifer A. Pietenpol. 2003. "Cell-Cycle Dysregulation and Anticancer Therapy." *Trends in Pharmacological Sciences* 24 (3): 139–145.
- Sutradhar, Manas, Rajeshwari, Tannistha Roy Barman, Alexandra R. Fernandes, Fabiana Paradinha, Catarina Roma-Rodrigues, M. Fátima C. Guedes da Silva, and Armando J.L. Pombeiro. 2017. "Mixed Ligand Aroylhydrazones and N-Donor Heterocyclic Lewis Base Cu(II) Complexes as Potential Antiproliferative Agents." *Journal of Inorganic Biochemistry* 175: 267–275.
- Tait, Stephen W. G., Gabriel Ichim, and Douglas R. Green. 2014. "Die Another Way – Non-Apoptotic Mechanisms of Cell Death." *Journal of Cell Science* 127 (10): 2135–2144.
- Topală, Tamara, Andreea Bodoki, Luminița Oprean, and Radu Oprean. 2014. "Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes." *Clujul Medical* 87 (4): 215–219.
- Torre, Lindsey A., Freddie Bray, Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-tieulent, and Ahmedin Jemal. 2015. "Global Cancer Statistics, 2012." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 65 (2): 87–108.
- Trofimenko, S. 1966. "Boron-Pyrazole Chemistry. I. Pyrazaboles." *Journal of the American Chemical Society* 89 (13): 3165–3170.

- Trudu, Federica, Filippo Amato, Petr Vaňhara, Tiziana Pivetta, E. M. Peña-Méndez, and Josef Havel. 2015. "Coordination Compounds in Cancer: Past, Present and Perspectives." *Journal of Applied Biomedicine* 13 (2): 79–103.
- Urruticoechea, A., R. Alemany, J. Balart, A. Villanueva, F. Vinals, and G. Capella. 2010. "Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview." *Current Pharmaceutical Design* 16 (1): 3–10.
- Vermeulen, Katrien, Dirk R. Van Bockstaele, and Zwi Berneman. 2003. "The Cell Cycle : A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer." *Cell Proliferation* 36 (3): 131–149.
- Vermeulen, Katrien, Dirk R. Van Bockstaele, and Zwi N. Berneman. 2005. "Apoptosis: Mechanisms and Relevance in Cancer." *Annals of Hematology* 84 (10): 627–639.
- Vogelstein, Bert, and Kenneth W. Kinzler. 2004. "Cancer Genes and the Pathways They Control." *Nature Medicine* 10 (8): 789–799.
- Wang, Chi-Yun, and Chiou-Feng Lin. 2014. "Annexin A2: Its Molecular Regulation and Cellular Expression in Cancer Development." *Disease Markers* 2014:1–10.
- Weinberg, Robert A. 2013. "The Biology of Cancer." *Garland Science*.
- Whitesell, Luke, and Nancy U. Lin. 2012. "HSP90 as a Platform for the Assembly of More Effective Cancer Chemotherapy." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1823 (3): 756–766.
- Wirtz, Denis, Konstantinos Konstantopoulos, and Peter C Searson. 2011. "The Physics of Cancer: The Role of Physical Interactions and Mechanical Forces in Metastasis." *Nature Reviews Cancer* 11 (7): 512–522.
- World Health Organization. 2018. "World Health Organization Cancer Fact Sheet." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acedido a 21/4/2018.
- Yao, Yi, Xiao Yuan Jia, Hong Yu Tian, Yu Xiang Jiang, Gen Jun Xu, Qi Jun Qian, and Fu Kun Zhao. 2009. "Comparative Proteomic Analysis of Colon Cancer Cells in Response to Oxaliplatin Treatment." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1794 (10): 1433–1440.
- Zhang, Baolin, Yaqin Zhang, Marie Claire Dagher, and Emily Shacter. 2005. "Rho GDP Dissociation Inhibitor Protects Cancer Cells against Drug-Induced Apoptosis." *Cancer Research* 65 (14): 6054–6062.
- Zhang, Long, Qing Ji, Zhen-Hua Ni, and Jian Sun. 2012. "Prohibitin Induces Apoptosis in BGC823 Gastric Cancer Cells Through the Mitochondrial Pathway." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13 (8): 3803–3807.
- Zhang, Xinbo, Jenn Chen, Bruce Davis, and Frederick Kiechle. 1999. "Hoechst 33342 Induces Apoptosis in HL-60 Cells and Inhibits Topoisomerase I in Vivo." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 123 (10): 921–927.
- Zhivkova, Zvetanka D. 2015. "Studies on Drug – Human Serum Albumin Binding : The Current State of the Matter." *Current Pharmaceutical Design* 21 (4): 1817–1830.

6. Anexo

6.1. Anexo A

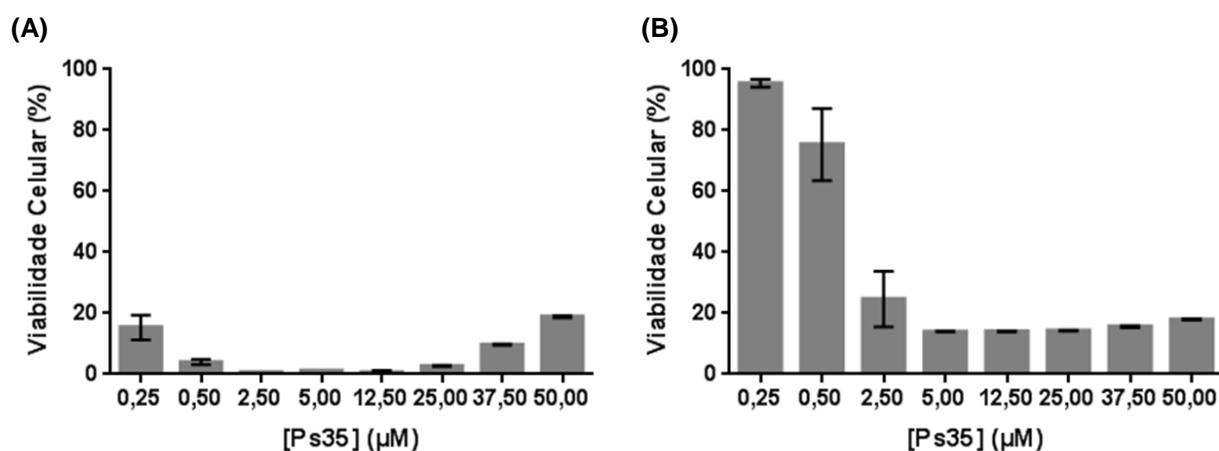


Figura 6.1 - Viabilidade celular da linha tumoral A2788 **(A)** e HCT116 **(B)** após 48 horas de exposição ao composto Ps35. Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao veículo de controle (0,1 % (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a dois ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM.

6.2. Anexo B

Tabela 6.1 - Constituintes e respectivos volumes das soluções preparadas para o ensaio de HRM.

	Ps35 (100 µM)	DNA (amplicão)	Tampão Fosfato 20 mM, 100mM NaCl	DMSO	dH ₂ O	EvaGreen 5x
DNA + Ps35 + Evagreen	4 µL	5 µL	7 µL	-	-	4 µL
DNA + DMSO + Evagreen	-	5 µL	7 µL	4 µL	-	4 µL
Ps35 + Evagreen	4 µL	-	7 µL	-	5 µL	4 µL
DMSO + Evagreen	-	-	7 µL	4 µL	5 µL	4 µL
DNA + Ps35	-	5 µL	7 µL	-	4 µL	-
DNA + DMSO	-	5 µL	7 µL	4 µL	4 µL	-
Ps35	4 µL	-	7 µL	-	9 µL	-
DMSO	-	-	7 µL	4 µL	9 µL	-

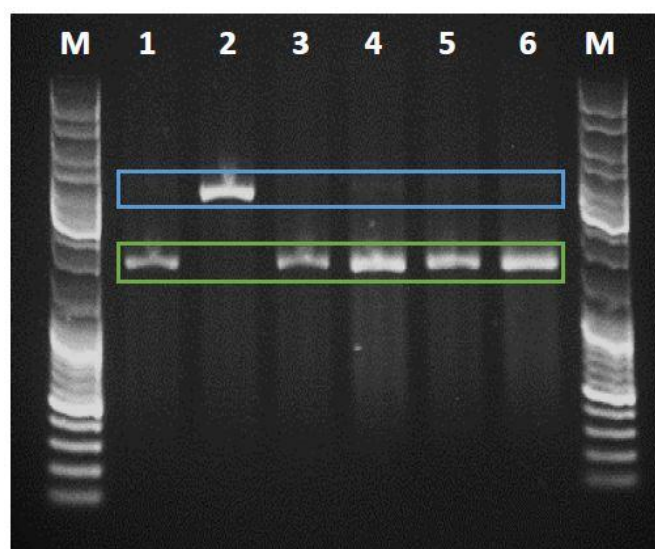


Figura 6.2 - Avaliação da mobilidade eletroforética da interação entre pDNA (pUC18) e o composto Ps35. O pDNA foi incubado na presença de concentrações crescentes de composto (50, 100 e 200 μM) ou na ausência deste (1 % DMSO (v/v); controle), em tampão fosfato 20mM, 100 mM NaCl (pH 7.0), durante 24 horas a 37 °C. Lane M: marcador de pesos moleculares *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Lane1: pUC18; Lane2: pUC18 linearizado; Lane3: pUC18 com DMSO 1% (v/v); Lanes4-6: pDNA incubado na presença de concentrações crescentes de Ps35 (50, 100 e 200 μM , respetivamente). Os retângulos superior e inferior referem-se às formas linear e superenrolada do DNA plasmídeo, respetivamente.

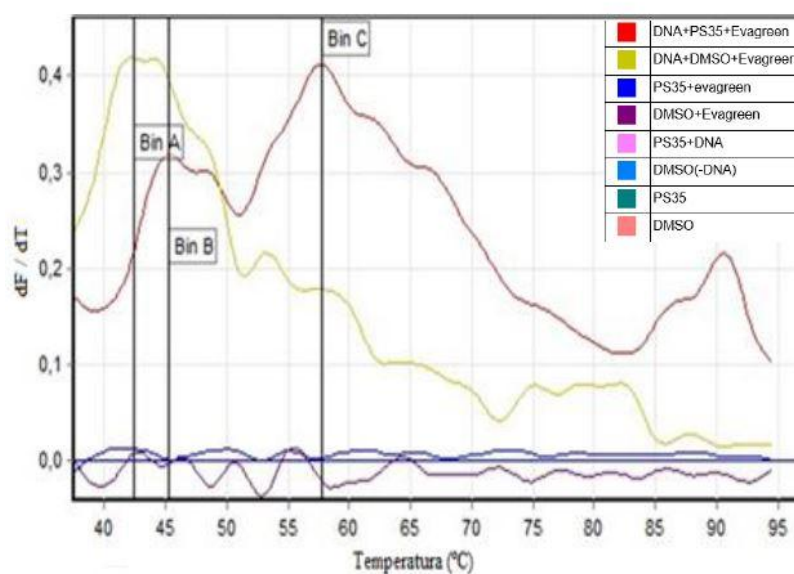


Figura 6.3 – Primeiras derivadas das curvas de *melting*, obtidas no ensaio de *HRM* com os amplicões *MYBPC3_ex7* após incubação com Ps35 (100 μM), indicadoras da temperatura de *melting* (T_m) dos amplicões. (Cada *bin* representa a marcação manual de um pico observado no gráfico).

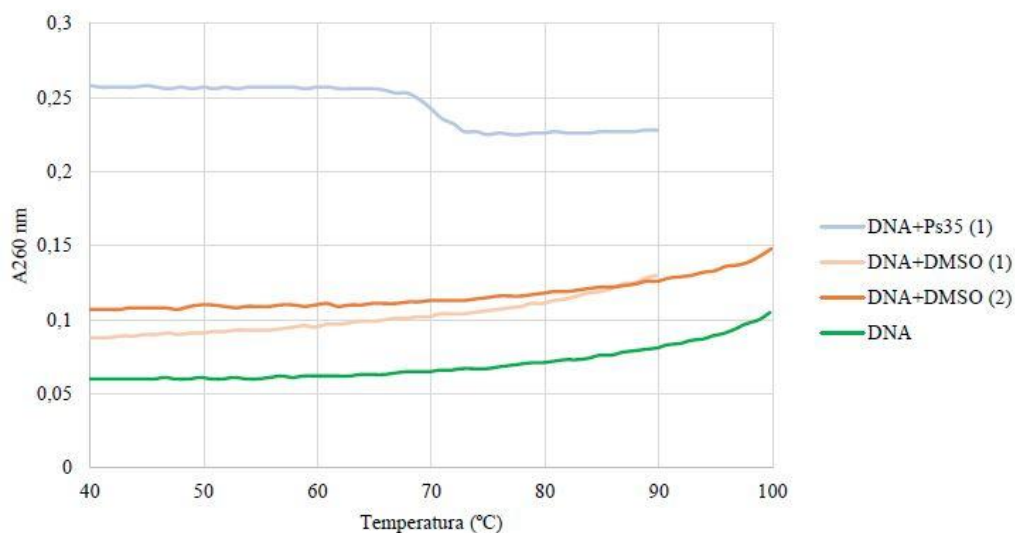


Figura 6.4 - Perfis de *melting* obtidas para amostras analisadas nos ensaios espectroscópicos de desnaturação térmica. (1) refere-se às amostras do ensaio 1, e (2) às amostras do ensaio 2.

6.3. Anexo C

Number of GA Runs:	10
Population Size:	150
Maximum Number of evals:	medium ▼ 2500000
Maximum Number of generations:	27000
Maximum Number of top individuals that automatically survive:	1
Rate of Gene Mutation:	0.02
Rate of Crossover:	0.8
GA Crossover mode:	twopt ▼
Mean of Cauchy distribution for gene mutation:	0.0
Variance of Cauchy distribution for gene mutation:	1.0
Number of generations for picking worst individual:	10
<div>Accept</div> <div>Close</div>	

Figura 6.5 - Parâmetros utilizados no docking molecular.

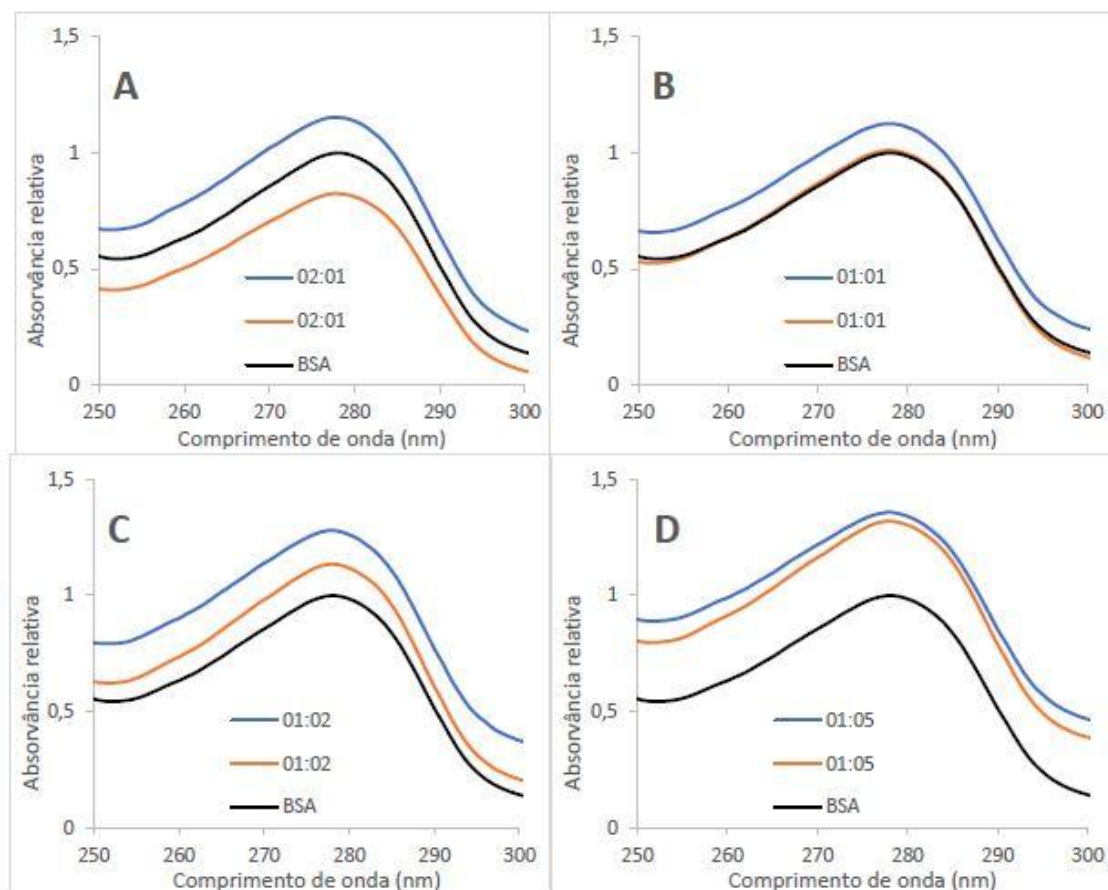


Figura 6.6 - Espectros de absorção em UV-Visível de interação entre 15 μM de BSA e concentração variável de Ps35. Diferentes raios de interação (**A**: 2 BSA : 1 Ps35; **B**: 1 BSA : 1 Ps35; **C**: 1 BSA : 2 Ps35; **D**: 1 BSA : 5 Ps35) após um período de 24 horas de incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$. Este espectro encontra-se normalizado em função da absorvância da amostra de proteína individual (a preto, servindo de referência), de modo a facilitar a interpretação da influência das interações.

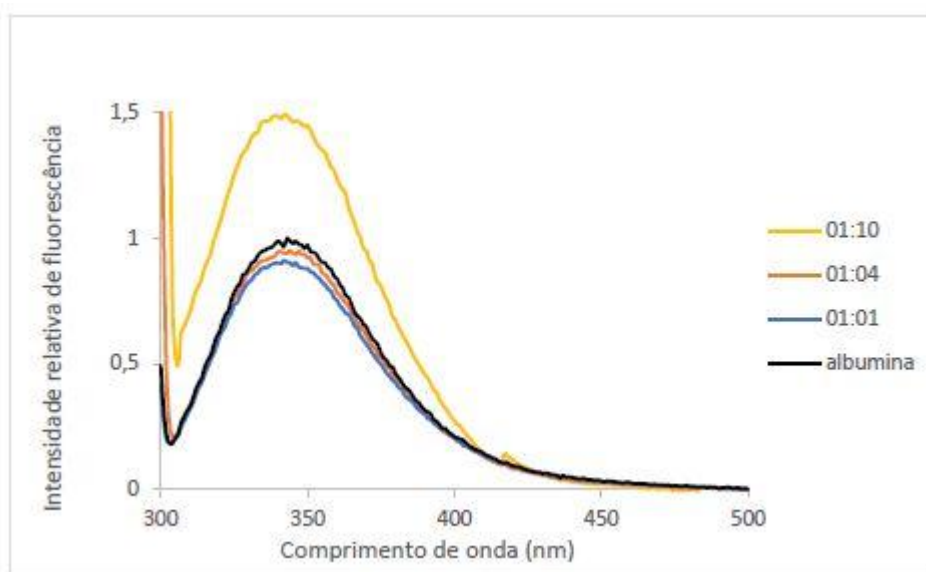


Figura 6.7 - Espectro de intensidade de fluorescência após excitação a 295nm para interações entre albumina e Ps35. A concentração da HSA é fixa (15 μM), sendo alterada a concentração de Ps35 entre amostras (15 μM a azul, 60 μM a laranja e 150 μM a amarelo). Os ensaios foram realizados após um período de incubação de 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Este espectro encontra-se normalizado em função da fluorescência da amostra de proteína individual (a preto), de modo a facilitar a interpretação da influência das interações.

Tabela 6.2 - Resultados de energia de ligação do composto Ps35 aos *binding site* 1 e 2 da HSA obtidos através de múltiplas experiências de simulação de docking molecular.

Grid	<i>Binding site 1</i>	<i>Binding site 2</i>
36X36X36	-1,79 kcal/mol	-3,77 kcal/mol
40X40X40	-3,09 kcal/mol	-3,87 kcal/mol
50X50X50	-3,1 kcal/mol	-6,13 kcal/mol

6.4. Anexo D

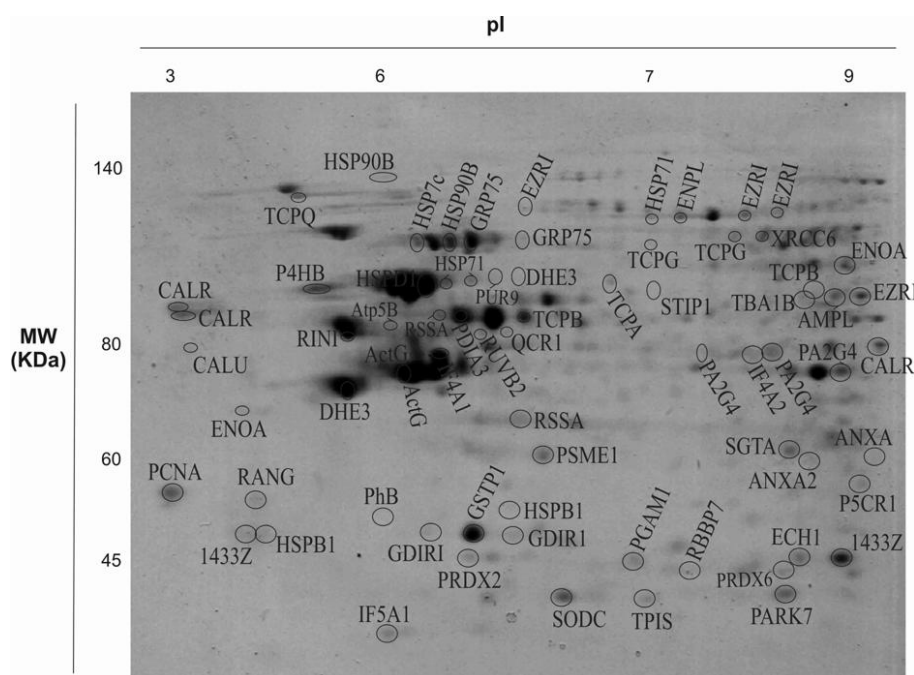


Figura 6.6 - Gel de referencia da linha celular HCT116.